



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE  
INDIRIZZO IN GENETICA MEDICA, MALATTIE METABOLICHE E  
NUTRIGENOMICA  
(Ciclo XXV)**

**“Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita  
e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove  
strategie molecolari di riprogrammazione di cellule  
umane adulte a scopo terapeutico”**

Direttore: Prof. EUSEBIO TOLU

Tutore: Dott.ssa Margherita Maioli

Tesi di Dottorato di:  
Dr.ssa Sara Santaniello

ANNO ACCADEMICO 2011-2012



# INDICE

INTRODUZIONE .....	1
1.1 MEDICINA RIGENERATIVA .....	6
1.2 ALLA RICERCA DELLE ORIGINI DELLE CELLULE STAMINALI.....	9
1.3 CLASSIFICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI.....	10
1.3.1 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI .....	11
1.3.2 CELLULE STAMINALI ADULTE .....	18
1.3.2 a CELLULE STAMINALI FETALI.....	19
1.3.2b CELLULE STAMINALI DEGLI ANNESSI EMBRIONALI .....	20
1.3.2 c CELLULE STAMINALI ADULTE PROPRIAMENTE DETTE .....	24
1.3.2d CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI.....	27
1.4 SELF-RENEWAL E PLASTICITA' .....	31
1.5 INFLUENZA DEI FATTORI INTERNI O DEL MICROAMBIENTE NEL DIFFERENZIAMENTO O NELL' AUTORIGENERAZIONE .....	34
1.6 CELLULE SOMATICHE: FIBROBLASTI.....	41
1.7 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (IPS) .....	44
2 ORIENTAMENTO FENOTIPICO DELLE CELLULE STAMINALI.....	49
2.1 STIMOLI CHIMICI.....	49
2.2 STIMOLI FISICI .....	53
3. SCOPO.....	57
4 MATERIALI E METODI.....	58
4.1 ESTERI DI ACIDO IALURONICO E DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE E STAMINALI MESENCHIMALI UMANE .....	58
4.1b ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA .....	60
4.1b NUCLEAR RUN-OFF TRANSCRIPTION ASSAY .....	61
4.1d IMMUNOFLUORESCENZA.....	62
4.1e IMMUNOBLOTTING.....	62
4.1f ANALISI DELL'IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA (CHIP).....	63
4.2 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI IN MODO ASSIMMETRICO A BASSA ENERGIA E CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE .....	64
4.2a PROTOCOLLO DI DIFFERENZIAMENTO DELLE STAMINALI EMBRIONALI MURINE R1 .....	64
4.2b ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA .....	65

4.2c IMMUNOFLUORESCENZA .....	66
4.2d IMMUNOBLOTTING.....	66
4.2e LE COLONIE BATTENTI .....	67
4.2f ANALISI STATISTICA.....	67
4.3 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI IN MODO ASSIMMETRICO E FIBROBLASTI CUTANEI UMANI.....	67
4.3a PROTOCOLLO DI RIPROGRAMMAZIONE DEI FIBROBLASTI.....	67
4.3b VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ, DEL TASSO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE E DELL' APOPTOSI.....	68
4.3c PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA .....	69
4.3d CITOFLUORIMETRIA.....	69
4.3e IMMUNOFLUORESCENZA .....	70
4.2f ANALISI STATISTICA.....	70
5.0 RISULTATI E DISCUSSIONE .....	71
5.1 GLI ESTERI DI ACIDO IALURONICO GUIDANO L'ESPRESSIONE GENICA DELLE SMAD E MIGLIORANO L'ORIENTAMENTO VERSO IL FENOTIPO CARDIACO IN CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE E IN CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE .....	71
5.1a L'HBR MODULA L'ESPRESSIONE GENICA DI SMAD1,3,4, E 7 IN CELLULE GTR1 ES E FMHMSCS .....	71
5.1b EFFETTI DELL'HBR SULL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE SMAD DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO CARDIACO IN CELLULE ES GTR1 E FMHMSCS.....	73
5.1c L'HBR AUMENTA LA TRASCRIZIONE DELLA SMAD4 IN NUCLEI ISOLATI .....	74
5.1d L' ESPRESSIONE GENICA DI NKX2.5 È MEDIATE DA SMAD4 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO CARDIACO INDOTTO DALL'HBR .....	75
5.1e DISCUSSIONE .....	76
5.2 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI IN MODO ASSIMMETRICO A BASSA ENERGIA SPINGONO IL DIFFERENZIAMENTO CARDIACO, NEURONALE E MUSCOLO SCHELETRICO IN CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE .....	78
5.2a RECF MODULANO L'ESPRESSIONE DEI GENI DEL DIFFERENZIAMENTO E DELLA STAMINALITÀ IN CELLULE ES GTR1 .....	78
5.2b EFFETTI DEI RECF SULL'ESPRESSIONE PROTEICA DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE ES GTR1 .....	80
5.1c DISCUSSIONE .....	80
5.3 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI (RECF) RIPROGRAMMANO DIRETTAMENTE I FIBROBLASTI CUTANEI UMANI VERSO IL FENOTIPO CARDIACO-NEURONALE- MUSCOLO SCHELETRICO .....	81
5.3a EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AI RECF SULLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E APOPTOSI IN FIBROBLASTI CUTANEI UMANI.....	81

5.3b I RECF INDUCONO L'ESPRESSIONE DEI GENI CARDIACI, NEURONALI E MUSCOLO SCHELETRICI .....	81
5.3c ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA DEI DIFFERENZIAMENTI INDOTTI NEI HSFS .....	82
5.3d HSFS TRATTATI CON IL REAC DIRETTAMENTE RIPROGRAMMATI IN UNO STATO DI IPS PERSISTENTE .....	83
5.3f DISCUSSIONE .....	84
5.4 CONCLUSIONI.....	86
BIBLIOGRAFIA.....	88
FIGURE .....	100
HBR e GTR1-FMhMSCs.....	100
REAC e ES R1 .....	109
REAC e HFF1 .....	114

## INTRODUZIONE

Le problematiche associate al trattamento di patologie legate alla perdita di funzionalità o al semplice invecchiamento di organi e tessuti hanno orientato, negli ultimi anni, l'interesse della ricerca scientifica verso la medicina rigenerativa. L'obiettivo è quello di ripristinare la funzionalità degli organi compromessi, o almeno di migliorarla.

In verità tutta la medicina, ad eccezione di quella preventiva, può essere definita *rigenerativa*, e si pone perciò l'esigenza di una definizione più puntuale e precisa di questo nuovo orizzonte.

*La Medicina rigenerativa identifica l'insieme delle ricerche e delle terapie che, nel perseguire l'obiettivo della rigenerazione, utilizzano le cellule staminali.*

Parliamo di terapie cellulari: le protagoniste di una nuova era scientifica sono appunto le cellule staminali (SCs), esse potrebbero essere utilizzate per curare malattie genetiche e degenerative come le malattie cardiovascolari, muscolari neurologiche, quali il Parkinson e Alzheimer, patologie gastrointestinali e epatopatie croniche.

Si sono aperti, così, diversi scenari di intervento e tra essi la possibilità di inserire fattori di crescita nel sito danneggiato, in modo da stimolare le cellule a rigenerare il tessuto, o alternativamente lo sviluppo di biomateriali per l'ingegneria tissutale, come polimeri biomimetici e scaffold tridimensionali bioattivi, capaci di indurre specifiche risposte cellulari e di dirigere la formazione di nuovi tessuti da impiantare in vivo.

Le SCs esistono in tutti gli organismi multicellulari e sono cellule indifferenziate, capaci di dare origine a diverse progenie mature e di auto-mantenersi, esse giocano un ruolo centrale nella omeostasi, generando nuove cellule mature per aumentare la massa tissutale durante la crescita pre- e post-natale, e rimpiazzare le perdite cellulari dovute a senescenza o danno.

Le SCs possiedono una organizzazione gerarchica: dalla totipotenza dello zigote, alla pluripotenza delle SCs embrionali (ESCs), alla multipotenza delle SCs adulte (ASCs).

Le ESCs possono costituire una sorgente facilmente disponibile di cellule trapiantabili per trattamenti rigenerativi, benché, la possibilità di rigetto o di trasformazione neoplastica nei riceventi rappresenta l'ostacolo principale per il successo e la sicurezza di applicazioni cliniche basate sulle ESCs (Evans M.J., 1981).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Un'altra risorsa promettente è costituita dai tessuti fetali, placentari, dal liquido amniotico (De Coppi et al., 2007), dal sangue del cordone ombelicale e dagli organi adulti sede delle ASCs, le cellule staminali adulte.

Numerosi studi hanno indicato che le cellule staminali da cordone ombelicale (CBSCs) sono una sorgente accessibile di SCs multipotenti, apparentemente non immunogeniche e non tumorigeniche, che una volta isolate, possono essere costrette ad espandersi e differenziarsi fornendo la possibilità di generare diversi tipi di progenie funzionali, terapeuticamente utili, adatte a sostituire cellule e tessuti danneggiati. La plasticità e accessibilità delle CBSCs hanno fornito le caratteristiche fondamentali per la creazione di Banche del cordone, dove queste cellule possono essere collezionate e conservate per utilizzi futuri (Benirschke K 2006).

Alla fine della gestazione le ASCs rimangono come cellule staminali residenti all'interno del tessuto d'origine, generando cellule mature per la rigenerazione e il rinnovamento dell'organo. ASCs sono state identificate in vari tessuti come ad esempio nel midollo osseo (BM), nella pelle (Jensen U.B., 1999), nella mucosa gastrointestinale (He X.C., 2004) e nel fegato (Sell S. 2001).

Le ASCs risiedono in un microambiente fisiologicamente limitato e specializzato, detto *nicchia*, che varia in natura e sede a seconda del tipo tissutale, le interazioni reciproche fra le ASCs e la loro *nicchia*, attraverso connessioni cellula-cellula e cellula-matrice, nonché attraverso la secrezione di fattori solubili, influenzano e guidano il loro comportamento (Alvarez C.V., 2012).

Un tipo particolarmente promettente di cellule staminali adulte per la medicina rigenerativa è quello delle cellule staminali mesenchimali. Grazie alle loro particolari caratteristiche le MSC vengono oggi considerate come il candidato più promettente da utilizzare in medicina rigenerativa/riparativa, in terapia cellulare ed in ingegneria dei tessuti. Le MSC sono cellule pluripotenti, di forma stellata, mononucleate, che esprimono una specifica combinazione di molecole di adesione quali CD29, CD44, CD105, CD166, con proprietà antinfiammatorie/immunomodulanti. Il mesoderma, è così definito (*in mezzo, infusione*) per la capacità delle cellule staminali mesenchimali di diffondere e migrare durante lo sviluppo embrionale precoce tra l'ectoderma e l'endoderma. La capacità di migrare (incoraggiata da proteine e sostanze chimiche con azione chemiotattica rilasciate dalla porzione di tessuto danneggiata), e di riempire lo spazio delle cavità è l'elemento chiave della riparazione delle

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

ferite in organismi adulti e coinvolge le cellule staminali mesenchimali della pelle (derma), delle ossa (Periostio), o del muscolo (perimisio) (Caplan A.I. 1991).

L'attività migratoria delle cellule mesenchimali e la loro capacità di aggregarsi specificamente per formare strutture uniche durante lo sviluppo embrionale, o per riparare tessuti adulti danneggiati in risposta a stimoli locali, l'elevato potenziale proliferativo in vitro, il trofismo, la capacità antinfiammatoria, la possibilità di disporre di cellule off-the-self ed in modo particolare la loro possibilità di differenziarsi e transdifferenziarsi verso cellule specializzate (Scintu F., 2006), se impiantate nel giusto contesto e microambiente, fanno sì che le MSC possano essere uno strumento per la rigenerazione e la riparazione di tessuti danneggiati da traumi, malattie degenerative ed agenti patogeni.

Le cellule staminali stanno già lasciando i banconi di laboratorio per raggiungere il letto del malato, nonostante la conoscenza dei programmi di controllo che ne guidano il destino sia ancora incompleta. Prima che le terapie basate sulle cellule staminali possano entrare nella pratica clinica, alcuni aspetti critici debbono essere ulteriormente indagati, come la sicurezza a lungo termine, la tollerabilità, l'efficacia ed il potenziale cancerogenico.

Infatti per poter avere una terapia disponibile in clinica si dovrebbe disporre di cellule autologhe in grado di differenziarsi in maniera completa in linee cellulari funzionali, obiettivo ancora non pienamente raggiunto.

Per molti anni i ricercatori hanno pensato il processo di maturazione cellulare come un meccanismo irreversibile; una svolta importante nella storia delle staminali l'hanno data gli studi di John B. Gurdon e Shinya Yamanaka che è valso loro il premio Nobel nel 2012. Gurdon nel 1962 ha dimostrato che, nelle giuste condizioni, il DNA del nucleo di una cellula somatica adulta come l'enterocita, messo in un ovocita di mammifero, può essere riprogrammato tornando in uno stato indifferenziato. Yamanaka nel 2006 ha creato le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) prima utilizzando i fibroblasti embrionali murini (MEF) poi i fibroblasti cutanei umani (HDF) con la trasduzione retrovirale di 4 fattori: Oct3 / 4, Sox2, Klf4, e c-Myc.(Takahashi K.,2007). Questo approccio di ingegneria genetica, in grado di resettare cellule differenziate rendendole pluripotenti per poi differenziarle nei fenotipi voluti, non è pensabile possa avere a breve ricadute cliniche a causa dell'utilizzo di vettori virali, benchè sia di grande interesse, in quanto ha messo per la prima volta in evidenza come cellule adulte possano ripercorrere a ritroso il cammino verso la staminalità, se stimolate in

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



modo opportuno, non è pensabile possa avere a breve ricadute cliniche a causa dell'utilizzo di vettori virali, considerati non sicuri (Yamanaka S.2012).

Per decenni gli scienziati hanno usato la chimica nel tentativo di influenzare la crescita e il differenziamento cellulare e per massimizzare la versatilità differenziativa *pluripotenza* delle cellule staminali, utilizzando per incrementare il potenziale differenziativo di queste cellule sia molecole naturali come i fattori di crescita, che sintetiche come l'HBR un estere glicoconjugato di acido ialuronico (HA) con acido butirrico (AB) e acido retinoico (AR) che grazie alle proprietà dei suoi componenti aumenta la resa del differenziamento verso il fenotipo cardiaco e endoteliale (Ventura C.,2007). Al contrario degli stimoli chimici, il cui impatto sulle cellule è largamente studiato, gli stimoli fisici sono a tutt'oggi ampiamente trascurati, nonostante rappresentino un approccio nuovo e particolarmente interessante per studiare e controllare la plasticità delle cellule staminali (CS), mimando fattori in cui le cellule sono esposte in vivo e quindi modulando l'ambiente di sviluppo, la cosiddetta *nicchia staminale*, e guidando i complessi processi di adesione, proliferazione e differenziamento verso i fenotipi specifici, di fondamentale importanza nella rigenerazione dei tessuti. E' ormai ben noto, infatti, che le cellule staminali risiedono, proliferano e si differenziano all'interno di microambienti tridimensionali complessi (Alvarez C.V., 2012).

La riproduzione dello specifico microambiente nativo, indurrebbe le cellule staminali in vitro ad esprimere più efficacemente il loro potenziale rigenerativo. Variando opportunamente le proprietà dei substrati cui le cellule sono adese e le caratteristiche biochimiche e fisiche dell'ambiente di coltura, risulta infatti possibile promuovere in modo guidato il differenziamento cardiaco, muscolo scheletrico e neurale della popolazione cellulare in coltura (Scintu F., 2006).

Per quanto riguarda gli stimoli fisici ci sono recenti tendenze della ricerca che si interessano dello sviluppo di biomateriali per l'ingegneria tissutale, indirizzati alla progettazione di materiali polimerici biomimetici, di scaffold tridimensionali bioattivi, capaci di indurre specifiche risposte cellulari e di dirigere la formazione di nuovi tessuti (Shachar M., 2003), altre che utilizzano campi magnetici caratterizzati da frequenze estremamente basse (50Hz, 0,8Trms) con cellule staminali embrionali per aumentare in maniera significativa trascritti cardio-specifici, e quindi la resa cardiomiocitaria in coltura (Ventura C., 2005), ed infine altre

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

che utilizzano segnali elettrici da bioreattori per riprodurre nella coltura di cellule staminali uno specifico stimolo elettrico nel range del fisiologico, imitando quello prodotto nel tessuto cardiaco con evidente sviluppo progressivo di proprietà contrattili caratteristiche del tessuto stesso, compresi l'avvicinamento e l'allineamento cellulare per la formazione di sistemi ultrastrutturali organizzati (Tandon N., 2009).

Da queste considerazioni si potrebbe dedurre che i destini delle cellule staminali o somatiche, possano essere modulati per l'utilizzo clinico, soprattutto da stimoli fisici.

Questi risultati pongono il problema più generale del ruolo della fisica come possibile strumento per guidare l'orientamento delle cellule staminali e la riprogrammazione delle cellule somatiche verso uno stadio di pluripotenza. L'identificazione di stimoli fisici appropriati e la possibilità teorica di modulare l'esito dei diversi processi differenziativi, cambiando le caratteristiche di un medesimo stimolo (es. ampiezza, durata, intensità e forma di un campo magnetico), introdurrebbero elementi di notevole semplificazione procedurale e risparmio di costi nell'ottica di una futura medicina rigenerativa.

## 1.1 MEDICINA RIGENERATIVA

La medicina rigenerativa è costituita da un insieme di attività interdisciplinari, sia di ricerca che cliniche, volte a riparare e rigenerare tessuti ed organi compromessi dalla malattia piuttosto che dall'invecchiamento. Anziché sostituire il tessuto, l'obiettivo è di rigenerarlo biologicamente (Fortier R.A 2005).

Scopo della biologia rigenerativa è l'identificazione delle diversità cellulari e molecolari che distinguono il normale turnover tissutale dalla riparazione cicatriziale, al fine di ricreare un ambiente adatto alla rigenerazione in un tessuto adulto danneggiato.

Tale compito può essere raggiunto identificando la sorgente cellulare capace di rigenerare al meglio il tessuto danneggiato e il milieu più adatto per ospitare e istruire le cellule.

La Fonte Cellulare può essere considerata ideale quando è accessibile, facilmente espandibile in vitro, multipotente, capace di rigenerare stabilmente un tessuto funzionalmente maturo in vivo e scevra da rischi di trasformazione neoplastica. Nella pratica le cellule staminali (SC) sono quelle che si avvicinano maggiormente a tale modello. Finora sono state impiegate due principali categorie di SC: embrionali (ES) e dell'adulto (AS).

Si sta facendo sempre più strada il concetto che le proprietà fondamentali delle SC siano regolate da segnali e interazioni intercellulari entro il microambiente in cui esse sono indovate (*nicchie*) (Li L.,2005).

A tal proposito, la Matrice Extra Cellulare (ECM) gioca un ruolo cruciale, trasducendo alle cellule stimoli che provengono dall'esterno mediante segnali fisici e chimici (Li L.,2005).

Lo studio delle modificazioni della ECM in corso di rimodellamento, delle modificazioni fisiologiche e patologiche di struttura e funzioni del tessuto, ha come target quello di giungere a manipolazioni sperimentali delle componenti della matrice al fine di promuovere la rigenerazione tissutale (Li L, Xie T 2005).

Le potenzialità della medicina rigenerativa sono immense al punto da rendere assolutamente necessario ed estremamente importante continuare ad investire in questa branca così feconda, capace di individuare prospettive di cura per numerose patologie come il morbo di Alzheimer, l'ictus e il diabete che oggi affliggono la popolazione mondiale, minandone la qualità della vita (Chen W.W.2012).

Sfruttando lo spettro d'azione, vasto, vastissimo, della medicina rigenerativa si potrà sopperire alla carenza di organi per i trapianti.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Ad oggi sono due i principali filoni delle applicazioni terapeutiche. Il primo è rappresentato dalla rigenerazione di tessuti solidi con l'utilizzo di staminali per ricostruire in laboratorio una parte di tessuto della cornea, della pelle, del diaframma, o della trachea, che poi viene impiantato in soggetti affetti da gravi malformazioni congenite (Shachar M 2003). La prospettiva è quella di utilizzare delle cellule facilmente isolabili come ad esempio le cellule staminali presenti nel liquido amniotico per generare dei tessuti da trapiantare in bambini che nascono con gravi patologie.

Il secondo filone riguarda invece la terapia cellulare di malattie che non hanno un'origine genetica, con l'utilizzo di popolazioni cellulari ben caratterizzate, sottoposte a particolari trattamenti, quali ad esempio la selezione cellulare, l'espansione in vitro, la generazione di cloni antiinfettivi o anti neoplastici (Piscaglia A.C.2008).

I primi tentativi per tradurre la ricerca sulle SCs in nuove strategie terapeutiche sono stati compiuti: ad esempio il trapianto di SCs derivate dal midollo osseo è divenuto un'opzione per il trattamento del morbo celiaco e delle malattie infiammatorie croniche intestinali come il morbo di Chron (CD) (Hasselblatt P, 2012) e la colite ulcerosa (UC) (Danese S. 2011). Il trapianto autologo di HSCs in un gruppo selezionato di pazienti affetti da celiachia refrattaria ha determinato un significativo miglioramento del quadro istologico, associato a sorprendenti progressi clinici (Al-toma A., Visser OJ. 2006; Al-Toma A, Verbeek 2007). Le SCs possono essere utilizzate per il trattamento di altre patologie gastrointestinali ampiamente diffuse nella popolazione generale, come il diabete mellito (DM). Negli ultimi vent'anni, sono state proposte nuove strategie terapeutiche per il trattamento del DM, come la somministrazione di fattori di crescita, il trapianto di isole pancreatiche e l'infusione di SCs per rimpiazzare le cellule-*beta* disfunzionali (Gangaram-Panday ST 2007). Sono state proposte varie sorgenti di SCs extrapancreatiche, inclusi il cordone ombelicale e il midollo osseo. L'efficacia di queste risorse per il trattamento del DM è stata provata in topi diabetici, in cui l'infusione di SCs derivate dal midollo osseo è stata in grado di ripristinare normali livelli glicemici (Cavallari G, Ventura C. 2012) (Zhao Y, Wang H 2006) (Tang DQ, Cao LZ 2004). Nel complesso, le SCs sono strumenti promettenti su cui si basa la medicina rigenerativa per il trattamento di patologie umane.

Non essendo possibile sottoporre, i tessuti prodotti in vitro o le colture cellulari a procedure di sterilizzazione senza incidere sulla loro vitalità e quindi sulle loro proprietà terapeutiche, tutti

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

questi trattamenti devono essere eseguiti in condizioni che garantiscano un bassissimo livello di contaminazione ambientale, allo scopo di ridurre il rischio microbiologico associato (Verfaillie C. M.,2002). La produzione di tessuti o prodotti cellulari utilizzati in protocolli clinici sperimentali segue un iter ben definito che prevede una fase preclinica, una fase di validazione ed un iter approvativo.

La normativa italiana prevede, infatti, che l'autorizzazione alla sperimentazione anche per quanto riguarda i prodotti per terapia cellulare, sia concessa dal Comitato etico locale sulla base di un parere favorevole espresso da una Commissione ad hoc operante dal 1977 presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che si avvale di esperti interni all'ISS per le valutazioni. La Commissione rilascia il proprio parere in merito ai requisiti dei prodotti cellulari e ne accerta la loro innocuità prima della sperimentazione clinica sull'uomo. La domanda di accertamento dei requisiti oltre che alla commissione ISS, deve essere trasmessa al Ministero della Sanità, Direzione generale per la valutazione dei medicinali e la farmacovigilanza. Con Decreto del Presidente dell'Istituto superiore di Sanità del 26 aprile 2002, è stata stabilita la struttura del dossier da sottoporre per l'autorizzazione che prevede i seguenti capitoli: descrizione generale, documentazione sulla qualità, documentazione sulla inattivazione/rimozione virale (opzionale), documentazione sulla farmacologia, documentazione sulla tossicologia generale e safety farmacologica, documentazione sulla mutagenesi, documentazione clinica. In particolare per i prodotti per terapia cellulare, la documentazione sulla qualità dovrà includere: la descrizione del processo di produzione e delle manipolazioni estensive che si intendono effettuare; l'identificazioni dei componenti cellulari, dei terreni di mantenimento e dell'attività biologica desiderata per il prodotto per terapia cellulare; la descrizione dei materiali ausiliari ed additivi utilizzati durante il processo di produzione ma non presenti nel prodotto finale; la descrizione degli apparati utilizzati e della tipologia degli ambienti da dedicare alla preparazione ed alla somministrazione del prodotto; i controlli di qualità e sicurezza effettuati durante il processo di produzione.

Il passaggio dagli studi preclinici alla pratica clinica deve necessariamente imporre una più scrupolosa analisi del bilancio rischi-benefici, dato che la sicurezza a lungo termine della maggior parte di questi trattamenti non è stata ancora valutata e che, una volta attuati, i trapianti di SCs non sono facilmente reversibili. Tra i rischi di terapie basate sulle SCs, oltre al possibile rigetto o alla perdita di funzione delle cellule trapiantate, il principale pericolo

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

consiste nella loro eventuale trasformazione neoplastica. Le SCs possono avere la capacità di curare malattie devastanti, ma le loro specifiche proprietà di auto-rinnovamento e clonogenicità possono renderle prone alla genesi di tumori (Al-Hajj M, Becker MW 2004, Li L, Neaves WB 2006).

## 1.2 ALLA RICERCA DELLE ORIGINI DELLE CELLULE STAMINALI

Nel 1868 ha origine grazie al biologo tedesco prof. Ernst Haeckel il termine “*staminali*” (stammzelle) da lui utilizzato nel suo lavoro “*Storia Naturale della Creazione*” per definire l’organismo unicellulare ancestrale da cui si sono generati tutti gli organismi multicellulari evoluti. Oggi l’espressione “*staminali*” (SCs) designa le protagoniste di una nuova era scientifica, le cellule che hanno la capacità di auto-rinnovarsi e di dare origine a cellule differenziate (Haeckel E., 1868).

I ricercatori avevano ipotizzato l’esistenza di cellule staminali a partire dall’inizio del XX° secolo, ma l’ipotesi non era mai stata confermata fino a che nel 1961 il Dr. Ernest McCulloch, con l’aiuto del biofisico James E. Till ha isolato ed identificato le cellule staminali a seguito dei risultati di una ricerca sugli effetti di un trapianto di midollo osseo in topi sottoposti a dosi massicce di radiazioni (Till J.E., 1961).

Nel 1963 sono state definite le proprietà fondamentali delle cellule staminali: cellule non specializzate capaci di dividersi in maniera illimitata dando origine contemporaneamente a una cellula staminale (caratteristica nota come autorinnovamento) e ad una cellula figlia o cellula progenitrice di transito, con capacità proliferativa limitata, destinata a differenziarsi in popolazioni di cellule altamente specializzate.

Le cellule staminali capaci di proliferare estensivamente prima dell’innesco del differenziamento (il differenziamento terminale è usualmente accoppiato all’arresto mitotico) sono state definite *clonogeniche* (Till J.E., 1964). **Error! Reference source not found.**

Il lavoro di questi studiosi ha cambiato il corso della ricerca sul cancro e illuminato la strada a quella che oggi chiamiamo medicina rigenerativa. L’uso di cellule staminali per i trapianti di midollo osseo e di molti altri tipi di ricerca sulle malattie è la nuova strada da percorrere.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

### 1.3 CLASSIFICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali possono essere distinte per alcune peculiarità: la potenzialità differenziativa o plasticità e il tessuto d'origine.

La capacità di un embrione di dare origine a tutti i tessuti dell'organismo adulto e la capacità di alcuni tessuti adulti di rigenerarsi durante tutta la vita è dovuta alla presenza di una particolare popolazione cellulare: le cellule staminali.

A seconda della loro potenzialità differenziativa, le staminali vengono definite *totipotenti* quando hanno la possibilità di trasformarsi in tutti i tipi di cellule dei tessuti embrionali e extraembrionali(placenta e cordone ombelicale), *pluripotenti* quando hanno la possibilità di differenziarsi nei vari tipi di cellule dei tessuti embrionali ma non dei tessuti extra embrionali, *multipotenti* in grado di specializzarsi in tutti i tipi cellulari di un tessuto, *oligopotenti* capaci di differenziarsi in pochi tipi cellulari ed infine *unipotenti* che evolvono verso un solo tipo di cellula per formare uno specifico tessuto (Young H.E 2004).

La cellula totipotente per eccellenza è lo *Zigote*, originato dalla fusione del gamete maschile con il gamete femminile, esso è capace di formare un organismo *in toto* (a livello embrionale, fetale ed adulto). La possibilità di dare origine ad un organismo *completo* permane, nell'uomo, per tre divisioni cellulari, ovvero finché l'embrione non raggiunge lo stadio di otto cellule, a partire dal quale i singoli blastomeri riducono il proprio potenziale differenziativo. Negli stadi embrionali successivi, morula e blastula, le cellule sono altamente plastiche e mantengono la capacità di formare vari sottotipi cellulari. In particolare, la blastula è fatta dalla Inner Cell Mass (ICM) costituita dagli embrioblasti pluripotenti, che hanno il compito di differenziarsi in uno qualsiasi dei tre strati germinali: *endoderma* (rivestimento interno dello stomaco, del tratto gastrointestinale, dei polmoni), *mesoderma* (muscoli, ossa, sangue, apparato urogenitale), o *ectoderma* (tessuti epidermici e del sistema nervoso) e creare un organismo completo, e la massa cellulare esterna costituita dai trofoblasti che porta alla formazione dei tessuti extraembrionali.

Con la progressione dello sviluppo ogni tessuto acquisisce, secondo le teorie più tradizionali, la propria cellula staminale somatica, cellula multipotente che ha quindi permanentemente una funzione tissutale specifica. Alcuni tessuti adulti di un organismo come l'epidermide, i capelli, il piccolo intestino e il sistema ematopoietico hanno un alto turn-over cellulare, processo conosciuto come *omeostasi*: le cellule staminali multipotenti proliferano e originano

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

cellule mature per aumentare la massa tessutale durante la crescita pre- e post-natale, e rimpiazzare le perdite cellulari dovute a senescenza o danno. Tali cellule sono considerate quindi multipotenti in quanto sono capaci di generare, differenziandosi, le cellule dello specifico compartimento in cui risiedono ne sono un esempio, le cellule staminali emopoietiche che possono dare origine a qualsiasi elemento cellulare presente nel sangue. Tra le cellule risultanti da tale passaggio esistono altre cellule staminali dal potenziale ridotto, definite unipotenti, che possono differenziarsi terminalmente in un solo elemento cellulare (ad esempio gli osteoblasti possono differenziarsi solo in osteociti), la cellula matura che ne deriva è definita *nullipotente* (Weissman I.L., 2000).

Le cellule staminali si distinguono anche per il tessuto d'origine in: *staminali embrionali* ESCs (Embryonic Stem Cells,) , le cellule pluripotenti collocate nella inner cell mass della blastocisti, e *staminali adulte* presenti in tutti i tessuti già formati che sono prevalentemente multipotenti e unipotenti, che hanno il compito di mantenere costante il numero di cellule dell'organismo e che comprendono le staminali fetali o FSCs (Fetal Stem Cell) presenti negli abbozzi degli organi fetali e le staminali neonatali o NSCs (Neonatal Stem Cell) isolate dal cordone ombelicale e dal liquido amniotico.

### 1.3.1 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le ESCs sono state isolate per la prima volta nel 1981 dall'epiblastopre-impianto della Inner Cell Mass della blastocisti di un embrione di topo, da due diversi gruppi di ricerca: Evans e Kaufman a Cambridge e Martin in California. La pluripotenza di queste cellule è stata dimostrata in maniera definitiva dall'osservazione che culture subclonali, derivate da singole cellule isolate, possono differenziarsi in un'ampia varietà di tipi cellulari (Evans M.J., 1981) e Martin G.R., 1981). Nel 1995 la ricerca di tali cellule è stata fatta anche nei primati non umani (Thomson J.A., 1995) ed infine nel 1998 sono state isolate da blastocisti umane (Thomson J.A., 1998). Varie colture di cellule embrionali di pesci, uccelli ed alcune varietà di mammiferi come il topo sono già di uso comune nella ricerca (Maioli M., 2011).

Le colture di ESC umane vengono ottenute da blastocisti, originate in seguito a pratiche di fecondazione assistita, inutilizzate e congelate, oppure da cellule germinali primordiali provenienti da embrioni di 5-9 settimane donati secondo il protocollo FIVET (Fertilizzazione

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



In Vitro con Embryo Transfer, una tecnica di procreazione assistita con fecondazione in vitro dell'ovulo e successivo trasferimento dell'embrione così formato nell'utero della donna). La metodologia di isolamento delle ESC è rimasta pressoché invariata dai primi anni in cui venivano condotti questi studi sui topi e consiste nella digestione della zona pellucida; gli embrioni, secondo la immunosurgical isolation vengono incubati in siero contenente anticorpi antitrofoectoderma, poi esposti al complemento che lisa le cellule del trofoblasto esterno della blastocisti lasciando scoperta la massa cellulare interna, che viene poi piastrata su un feeder layer di cellule mitoticamente inattive mentre con la mechanical isolation le cellule del trofoblasto sono rimosse meccanicamente. Le cellule risultanti hanno un elevato rapporto nucleo/citoplasma, nucleoli prominenti e una colonia con morfologia simile a quella delle cellule ES di scimmia (Pain B.1996).

In vivo, le ESCs rigorosamente dette, esistono solo per un breve periodo di tempo durante lo sviluppo pre-impianto dell'embrione, in parallelo con il procedere delle divisioni mitotiche, le cellule dell'embrione diventano poi specializzate e perdono la loro pluripotenza.

Già nella transizione da morula a blastula si evidenzia che i livelli di alcune proteine cambiano in relazione alla posizione occupata dalle cellule nella morula stessa; in quelle esposte verso l'esterno, che hanno meno contatti reciproci e quindi esprimono meno proteine di giunzione, come la Caderina E e la  $\beta$ -Catenina fondamentali per l'attivazione di fattori di trascrizione, i livelli di Oct-4, SOX2 e NANOG calano con conseguente perdita della pluripotenza. Esse andranno a formare il trofoblasto con la caratteristica di cellule staminali unipotenti, mentre in quelle più interne il livello di Oct-4, SOX2, e NANOG monoallelico rimane invariato con il mantenimento della pluripotenza fondamentale per la formazione della ICM.

Durante lo sviluppo pre-impianto l'ICM della blastula precoce è costituita da un gruppo eterogeneo di cellule pluripotenti divisibile in due sotto-popolazioni: le cellule Progenitrici dell'Epiblasto (P-EPI) e le cellule Progenitrici dell'Endoderma Extraembrionale (P-EnEx).

Le P-EPI e le P-EnEx sono morfologicamente indistinguibili, ma esprimono marcatori molecolari diversi: in particolare, nelle P-EPI prevale l'espressione di OCT4, SOX2 NANOG fondamentali per lo sviluppo dell'embrione, mentre nelle cellule P-EnEx prevalgono SOX7, GATA4 e GATA6, poichè hanno il compito di dare origine a cellule di tessuti

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

extraembrionali. Allo stadio di blastocisti tardiva, le P-EnEx migrano verso la cavità interna, o Blastocele, dando inizio al processo di differenziamento in Endoderma Primitivo (EPr).

Successivamente all'impianto l'EPr darà origine al parenchima del sacco vitellino (membrana esterna all'embrione, costituita dall'Endoderma Extraembrionale, EnEx), mentre le P-EPI danno origine alle cellule dell'epiblasto (EPI) pluripotenti, capaci quindi di dare origine a tutti i compartimenti cellulari dell'organismo adulto.

Dopo l'impianto le ESC dell'epiblasto, mostrano variazioni dell'espressione genica con una massiva proliferazione ed epitelizzazione, al termine di questa serie di trasformazioni le cellule EPI danno origine al feto, all'Amnion (il lato interno della membrana che lo ricopre durante la gravidanza) e al Mesoderma extraembrionale (il tessuto connettivo lasso che circonda completamente amnion e sacco vitellino) (Binas B. 2009).

Le ESC dell'epiblasto pre-impianto hanno attivo un programma di regolazione epigenetica, fondamentale per il mantenimento della pluripotenza. Si definiscono epigenetici quei meccanismi cellulari che producono effetti persistenti nel sistema biologico, senza comunque alterare la sequenza genomica. L'epigenetica consente dunque la modulazione dell'espressione del DNA o di strutture ad esso associate mediante particolari processi, quali ad esempio la metilazione del DNA e l'associata azione delle Methyl Binding Proteins (MBDs), la modificazione degli istoni con le proteine appartenenti al Polycomb Group (PcG) e al Trithorax Group (TrxG), il rimodellamento cromatinico o i meccanismi di attivazione trascrizionale a "feedback". Nello specifico, dei segnali extra- o intra- cellulari possono andare a stimolare specifici "propagatori" di segnale interni alla cellula, i quali, dopo aver attivato determinati pathways, producono effetti durevoli nel tempo, pur non avendo alterato in alcun modo la sequenza genomica.

Le cellule embrionali pluripotenti possono garantire il loro stato altamente indifferenziato mantenendo bassa o addirittura inibendo totalmente l'espressione di geni essenziali nello sviluppo, evidenziando che il sistema cellulare dispone dunque di differenti strumenti per raggiungere tale obiettivo. E' interessante sottolineare che le ESCs mostrano un elevato tasso di metilazione a livello delle CpG site nei Low CpG density promoters (LCPs), generalmente associati a geni dall'espressione tessuto-specifica. Diversamente, più del 95% dei High CpG

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

density promoters (HCPs), connessi a geni housekeeping o a geni dello sviluppo sottoposti ad un'elevata regolazione, contengono isole CpG non metilate. La regolazione dell'espressione di tali geni avviene grazie alla metilazione/demetilazione di elementi regolatori distali, enhancers o silencers, durante il dinamico processo differenziativo delle ESCs nei diversi fenotipi.

Un altro importantissimo meccanismo epigenetico è la modificazione di particolari residui amminoacidici nella porzione N-terminale degli istoni, i quali, infatti, possono essere acetilati, fosforilati, metilati, ubiquitinati, SUMOilati o sottoposti ad isomerizzazione perseguendo differenti obiettivi biologici (Ma D.K., 2010). In particolare, nelle ESCs le proteine PcG rivestono un ruolo essenziale nella repressione di geni differenziativi, come testimonia il fatto che i nucleosomi in corrispondenza dei principali geni dello sviluppo sono trimetilati a livello della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27) proprio per merito di Bmi-1, membro del Polycomb Repressor Complex (PRCs).

Le ESC dell'epiblasto pre-impianto hanno attivo un programma di regolazione epigenetica, fondamentale per il mantenimento della pluripotenza che prevede:

- un' alta espressione di fattori fondamentali per lo sviluppo embrionale con l'acetilazione degli istoni, la metilazione sulla lisina 4 dell'istone H3 e il conseguente rilassamento della cromatina per mantenere alta l'espressione dei 4 fattori di trascrizione di primo livello OCT4-SOX2-NANOG-KLF4, della E-cadherin (CDH1), estrogen-related receptor b (ESRRB), BMPs, Notch, Frizzled e DPP4 che coordinano l'espressione dei fattori di trascrizione di secondo livello DPP3, REX1 e GBX2, di marcatori di superficie SSEA4, i trasportatori ABC, di alcuni enzimi come la telomerase e alkaline phosphatase;
- il *reset* epigenetico, con la riattivazione del cromosoma X di origine paterna esclusivamente nelle ESC di embrioni di sesso femminile, con conseguente presenza di 2 cromosomi X attivi Xa/Xa confermata dalla cromatina nella conformazione aperta, questo *stato naive* sembra essere conservato anche in vitro;
- la regolazione epigenetica interviene anche sull'espressione di NANOG, il suo stato di metilazione sull'istone H3 è simile a quello di OCT4 (maggiore su H3/K4 e minore su H3/K9-K27), ha tre regioni di regolazione, la I e la II hanno lo stesso stato di metilazione anche nelle cellule del trofoblasto (TS), invece la III regione nelle ESCs a

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

monte è completamente non metilata e a valle è metilata per il 29%, con conseguente elevata espressione mentre nelle TS a monte è ipermetilata per il 79% e a valle ha una moderata metilazione del 50% con un evidente silenziamento e condensazione della cromatina (Hattori N., 2007);

- per il controllo indiretto in modo che ci sia un giusto livello d'espressione (non di più, niente di meno) dato dalla codipendenza di base dei fattori di trascrizione principali OCT4 e SOX2, è presente una sottile rete in cui ognuno di essi reprime la trascrizione dell'altro, proprio utilizzando la classica via del feedback negativo, però hanno allo stesso tempo la capacità di indurre l'espressione degli altri in un feedback positivo. Per esempio OCT-4 ha tre promotori, legati da vari fattori di trascrizione, in modo che il gene non solo sia trascritto o meno, ma esistano veri e propri livelli di espressione e ogni livello si traduce nella pluripotenza o in una diversa modalità di differenziamento delle cellule mantenendo un equilibrio,
- l'Eterodimerizzazione, come regolatore della pluripotenza, OCT4 ha due domini POU che legano il DNA, il POU homeodomain (POUHD) e il dominio POU specifico (POU), di per sé in grado di legare il DNA o solo con il POUHD o tramite entrambi i domini POU. L'eterodimero OCT4/ SOX2 consente il legame simultaneo dei due domini POU al DNA, perché Sox2 interagisce con le catene laterali stabilizzando la sua unione con il DNA, e questo ha implicazioni per la stabilità e la durata della trascrizione, anche NANOG è controllato dal complesso di OCT4/SOX2 e/o dal SOX element-binding factor (Blair K., 2011);
- la regolazione concentrazione-dipendente nota come *switching allelic* descrittaper l'espressione di NANOG, la cui concentrazione è direttamente correlata alla pluripotenza, infatti la riduzione in cellule ESC +/- eterozigoti induce il differenziamento. E' interessante notare, che le cellule della morula trascrivono NANOG da un singolo allele, che così esprime solo metà della dose di NANOG. Nello stadio di blastocisti, le ESC dell'epiblasto pre-impianto, l'espressione di NANOG è biallelica necessaria per la pluripotenza completa.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Con l'avanzare delle divisioni e l'impianto della blastocisti nell'endometrio uterino, l'espressione di NANOG torna monoallelica.

Sorprendentemente, quando un solo allele viene trascritto, il secondo allele non è silenziato in modo definitivo; non è noto il meccanismo che determina lo switching allelico però si esclude il fattore epigenetico, né se avviene per altri fattori di trascrizione, né se questo tipo di regolazione è conservata in hESC (Alvarez C.V., 2012).

Nel 2007 sono state isolate linee cellulari di topo dall'epiblasto dopo l'impianto della blastula nell'endometrio uterino, nominate cellule staminali epiblasto (EpiSCs) (Tesar P.J., 2007) (Brons I.G.M., 2007). Le cellule ESCs originate da ICM pre-impianto sono differenti dalle EpiSCs post-impianto perché rappresentano i diversi stadi di sviluppo da cui derivano il pre e il post-impianto della blastocisti nella parete uterina.

Le staminali embrionali ESCs che vengono isolate dalla massa cellulare interna della blastocisti prima dell'impianto in utero, sono cellule che mantengono in modo stabile la loro potenzialità differenziativa, sono come cellule pluripotenti in grado di dare origine a cellule germinali e ai tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma), sia *in vivo* che *in vitro* mediante appropriate condizioni di coltura. Hanno un cariotipo normale e diploide e hanno una capacità proliferativa a lungo termine molto elevata infatti sono ferme in fase S mancando del checkpoint di fase G1.

Una caratteristica importante è rappresentata dagli alti livelli di attività della telomerasi, una ribonucleoproteina con attività enzimatica che aggiunge ripetizioni telomeriche alle estremità cromosomiche mantenendo costante la lunghezza dei telomeri, (Thomson J.A., 1998). I telomeri umani consistono di ripetizioni della sequenza TTAGGG/CCCTAA alle estremità dei cromosomi, nelle ESCs l'elevata attività della telomerasi fa sì che rimangano lunghe 15 Kbp, infatti tali cellule possono essere coltivate *in vitro* per lunghi periodi di tempo anche oltre 2 anni superando 300-450 population doublings, mentre le linee cellulari somatiche diploidi, che non esprimono questo enzima a livelli abbastanza elevati, entrano in senescenza replicativa dopo circa 50/80 population doublings, con la vita limitata in coltura (Pain B., 1996) (Bodnar A.G. 1998).

Le EpiSCs hanno varie caratteristiche che ostacolano il loro utilizzo *in vitro*, esse infatti non sono clonogeniche, non rispondono al LIF attraverso la via di trasduzione del segnale delle

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

STAT3 per il mantenimento della pluripotenza, hanno una ridotta stabilità del cariotipo, una limitata capacità per la formazione di chimera e un limitato contributo alla linea germinale. In esse avviene una regolazione epigenetica, la metilazione del DNA nei promotori di geni specifici, la deacetilazione degli istoni, la metilazione della lisina 9 e 27 del istone H3 determinano il silenziamento genico e la formazione dell'eterocromatina condensata, con conseguente inattivazione casuale di un cromosoma Xi nella cellula femminile (Xa / Xi) .

Queste caratteristiche fanno sì che le EpiSCs siano pronte a rispondere agli stimoli induttivi dell'inizio della gastrulazione, evidenziati da un' aumentata espressione di marcatori di lineage-specifici, cioè i processi di attivazione e di silenziamento genico che consentono un indirizzamento verso il corretto differenziamento cellulare (Watanabe K., 2007).

Le hESCs possono offrire spunti per la comprensione di quali geni siano coinvolti e i loro livelli di espressione durante gli eventi dello sviluppo embrionale che non possono essere studiati direttamente in embrioni umani intatti.

Tramite il loro impiego si possono identificare gli eventi cellulari, molecolari e genetici che hanno conseguenze importanti nel settore clinico, che stanno alla base di molte anomalie cromosomiche, patologie congenite e malformazioni degli annessi extraembrionali e che causano sterilità, malformazioni fetali, aborto spontanei e tumori nei bambini. In particolare nel periodo pre- e post-impianto, la conoscenza del normale sviluppo umano è ampiamente limitata alla descrizione di un numero limitato di embrioni e alle analogie tratte dall'embriologia sperimentale di altre specie. Anche se il topo è il cardine dell'embriologia sperimentale dei mammiferi, strutture tra cui la placenta e le membrane extraembrionali, differiscono sostanzialmente dalla struttura corrispondente dell'embrione umano. In tale contesto le hESCs sono particolarmente utili per lo studio dello sviluppo e della funzione dei tessuti che differiscono tra topo e uomo (Thomson J.A., 1998).

Le hESCs sono in grado di autorinnovarsi e possono rimanere in coltura a lungo continuando a produrre cellule figlie identiche e, variando le condizioni di coltura, sono in grado di svilupparsi praticamente in qualsiasi tipo di cellula differenziata. Da questi risultati è emersa l'idea che le cellule staminali embrionali potessero essere una fonte potenzialmente illimitata

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

di cellule specializzate, utilizzabili in varie terapie, per la sostituzione ad esempio di cellule cerebrali nel caso di patologie neurodegenerative, cellule cardiache nel caso di patologie cardiache e così via.

La generazione di embrioni mediante la clonazione terapeutica consentirebbe inoltre agli scienziati di creare cellule staminali embrionali identiche a quelle del paziente, evitando così il problema del rigetto dei tessuti. Ma la clonazione è un processo lungo e difficile, limitato sia dalla scarsa disponibilità di ovuli di donatrici, sia da basse percentuali di successo. Questo significa che, per il momento, le cellule staminali embrionali identiche a quelle del paziente sono ben lontane dal costituire una strada terapeutica percorribile.

Anche le staminali embrionali normali, ossia non clonate, pongono una serie di problemi tecnici che attualmente ne precludono l'utilizzo clinico, esse infatti vengono fatte crescere a lungo in coltura accumulando potenziali mutazioni cancerose, una notizia non certo confortante volendo iniettarle nei pazienti. Per di più le colture di cellule staminali embrionali umane vengono attualmente sviluppate su cellule nutritive non umane, il che pone notevoli problemi di sicurezza. Infine i protocolli oggi adottati per ricavare tipi di cellule specifici dalle staminali embrionali non sono tutti coerenti e solidi, e devono necessariamente essere migliorati, soprattutto se è necessario lavorare su grandi numeri.

Poiché non è ancora chiaro il rischio di tumorigenicità indotto dal trapianto di tali cellule e soprattutto poiché il processo di estrazione di queste cellule necessita della distruzione dell'embrione, in Italia come in molti altri Paesi, motivi di ordine etico e legislativo (Legge del 19 febbraio 2004, n°40 Art. 13) impediscono la sperimentazione di embrioni umani. Per questo motivo è stato necessario ricercare una sorgente alternativa di cellule staminali, quali sono le cellule staminali da tessuto adulto.

### **1.3.2 CELLULE STAMINALI ADULTE**

Nonostante l'esistenza di cellule staminali sia stata postulata prima nei tessuti adulti e poi in quelli embrionali, per parecchi anni l'interesse che questi ultimi hanno suscitato è stato superiore a quello determinato dai tessuti adulti a causa della maggiore plasticità e capacità di autorinnovamento. Da una parte difficoltà sperimentali e dall'altra problemi etici hanno in

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

seguito spostato questo interesse anche sulle staminali adulte (cellule staminali organo- e tessuto-specifiche) che si sono dimostrate non da meno di quelle embrionali. Le cellule staminali adulte possono essere isolate da vari tessuti di mammifero durante tutto il periodo dello sviluppo fetale e dall'adulto.

### 1.3.2 a CELLULE STAMINALI FETALI

Esistono cellule staminali anche al di fuori dell'embrione, sia nei tessuti fetali e negli annessi extraembrionali che nei tessuti adulti, nonostante si ritenga che, in proporzione, il loro numero e la loro multipotenza vadano diminuendo con l'età. I tessuti fetali sono di certo una fonte più ricca e qualitativamente migliore di cellule staminali rispetto ai tessuti adulti, nonostante abbiano una multipotenza ridotta a confronto delle staminali embrionali.

Esse si trovano negli stadi tardivi dell'embrione e nel feto e sono cellule pluripotenti. Le cellule staminali fetali (*FSCs foetal stem cells*) sono le cellule che in utero provvedono all'accrescimento dei tessuti e che, dopo la nascita diventeranno staminali adulte unipotenti. Esse si trovano nei tessuti fetali quali sangue, fegato, midollo osseo, pancreas, milza e reni. Le cellule staminali fetali vengono isolate da feti abortiti per motivi medici o spontanei e da tessuti prelevati per la diagnosi prenatale, previo consenso informato, con approvazione etica e rispetto delle linee guida nazionali in tema di ricerca riguardanti tessuto fetale.

Le staminali fetali hanno caratteristiche particolari, infatti uniscono gli aspetti positivi delle staminali embrionali e delle staminali adulte. Come le staminali adulte sono specializzate nella creazione di un tessuto, quindi non occorrono interventi esterni per *convincerle* a produrre un determinato tipo di cellule; il rischio di tumori, in eventuali trapianti, è molto più limitato che nel caso delle embrionali e il loro utilizzo non presenta problemi etici in quanto per reperirle si possono utilizzare i feti abortiti per motivi medici o spontanei. Come le staminali embrionali hanno una proliferazione elevata, infatti devono in primis creare un tessuto e non mantenerlo (Verfaillie et al., 2002).

Sono state utilizzate cellule staminali fetali cerebrali umane per la cura di pazienti affetti da morbo di Parkinson e, in alcuni casi, i miglioramenti clinici ottenuti sono stati rilevanti (Lindvall 2004). Nonostante il successo apparente, le staminali fetali presentano però uno svantaggio importante: il materiale di origine è estremamente limitato. Un'ulteriore limitazione delle cellule fetali è che non hanno praticamente alcuna potenzialità di utilizzo per

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico



le terapie in cui sono necessarie cellule identiche a quelle del paziente, a meno di non sviluppare tecniche in utero che consentano di agire sul feto stesso. Per queste motivazioni, per le cellule fetali, sussistono molte limitazioni per quanto riguarda i pazienti e la gamma di malattie per cui possono essere impiegate, pertanto è abbastanza improbabile che possano fornire un contributo significativo allo stuolo di terapie cellulari volte a combattere le malattie.

### **1.3.2b CELLULE STAMINALI DEGLI ANNESSI EMBRIONALI**

Anche il tessuto placentare attira l'interesse come sito alternativo di cellule da impiegarsi nella medicina rigenerativa, data la plasticità di molte delle cellule isolate da differenti regioni placentari.

Inoltre, la placenta, che è coinvolta nel processo di mediazione della tolleranza fetale, contiene cellule che possiedono proprietà immunomodulatorie (Mellor and Munn, 2000). Queste due caratteristiche possono dimostrarsi fondamentali per la loro prossima applicazione clinica. Il tessuto placentare è facilmente recuperabile e manipolabile senza procedure invasive e non solleva questioni etiche.

La placenta a termine è una struttura discoidale, del diametro di 15-25cm, dello spessore di 3cm, con la funzione primaria di garantire gli scambi nutritivi, di gas e di soluti tra madre e feto, alla nascita si distacca dalla parete uterina e, circa trenta minuti dopo viene anch'essa espulsa dalla cavità uterina.

La placenta è costituita da due componenti: la decidua basale di derivazione materna, e il corion di derivazione fetale. Il corion prende è a contatto con la decidua endometriale materna, ed si distingue in due regioni coriali: quella mesenchimale da cui vengono isolate le cellule coriali mesenchimali stromali e(hCMSC o COR-MS) e quella trofoblastica , a contatto con la madre fatta dalle cellule coriali trofoblastiche (hCTC).

Il feto è contenuto all'interno della membrana amniotica (amnios) immerso nell'liquido amniotico sempre di derivazione embrionale. L'amnios in contiguità al corion, è molto sottile e avascolarizzato, ha il compito di sostenere e proteggere il feto in crescita ed è costituito internamente, da uno strato di cellule epiteliali (AEC) che poggia sulla membrana basale, ed esternamente da uno strato di tessuto connettivo vascolare, il mesoderma amniotico, in cui risiedono le cellule stromali mesenchimali (hAMSC o AM-MS)(Parolini et al., 2007).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Dalla porzione fetale son state isolate mediante separazione meccanica e successiva digestione enzimatica, le cellule mesenchimali fetali (FMhMSCs human mesenchymal stem cells fetal membranes of term placenta) distinte in cellule staminali mesenchimali corioniche (CMC) e cellule staminali mesenchimali amniotiche (AMC). Le cellule isolate dall'amnios sono divise in due gruppi a seconda dell'origine embrionale: le cellule epiteliali amniotiche che derivano dall'ectoderma embrionale e le cellule mesenchimali amniotiche (AM-hMSCs mesenchymal cells derived from amnion Amniotic Membrane-human Mesenchymal Stromal Cells) che derivano dal mesoderma embrionale (Horwitz E.M.,2005).

Le cellule AMC e CMC dimostano di essere morfologicamente indistinguibile dalle mesenchimali del midollo osseo (BM-MSc) ma hanno una capacità proliferativa maggiore, in vitro sono in grado di formare colonie che vengono espanse per almeno 15 passaggi senza cambiamenti morfologici visibili, quando coltivate in specifiche condizioni dimostrano un elevata plasticità(Alviano F., 2007).

Le MSC isolate dalla placenta nel primo e nel terzo trimestre di gravidanza sono in grado di differenziarsi in percentuale diverse, nella linea condrogenica, miogenica e neurogenica, e con grandi differenze in relazione alla diversa origine (corion e amnios) (Portmann-Lanz C.B.2006).

Fino ad una ventina di anni fa i medici gettavano via la placenta ma anche un altro annesso fetale, il cordone o funicolo ombelicale, inconsapevoli del suo valore per la ricerca delle cellule staminali.

Il cordone ombelicale comincia a formarsi nel primo mese di vita del feto, quando le cellule della morula (stadio dello sviluppo dello zigote costituito da 8 a 16 cellule), che daranno origine all'embrione, si differenziano da quelle che costituiranno la placenta e gli annessi fetali (il sacco amniotico e, appunto, il cordone ombelicale). Al suo interno ci sono tre vasi sanguigni: una vena e due arterie; la vena porta al bambino l'ossigeno e il nutrimento che provengono dal sangue della mamma, le arterie invece permettono al piccolo di eliminare le scorie. Questi tre canali sono ricoperti da un tessuto gelatinoso denominato gelatina di Wharton, che costituisce l'impalcatura del cordone. Al momento della nascita il cordone può misurare fino a 60-65 cm di lunghezza, da esso si possono isolare due tipi cellulari (emopoietico e mesenchimale).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

L'impiego del sangue da cordone è riservato al trapianto in pazienti pediatrici perché la quantità ottenibile non è tale da essere utilizzata nel trattamento di pazienti adulti, anche se il potenziale di crescita nelle colture a lungo termine delle cellule staminali cordonali appare superiore a quello delle cellule di origine midollare e consente lo studio di metodi per aumentarne il numero.

Oltre a questo problema esiste la possibilità che le cellule del sangue donato presentino difetti genetici che potrebbero provocare una malattia in chi le riceve. Tali malattie potrebbero non risultare evidenti nel donatore per mesi o addirittura anni, periodo durante il quale il sangue potrebbe già essere stato donato ad altri. Parallelamente a quanto accaduto per lo studio del sangue midollare, anche nel cordone ombelicale è stata dimostrata la presenza di cellule staminali mesenchimali e anche in questo caso tali cellule sembrano più interessanti di quelle isolate dal midollo in quanto sono più facilmente ottenibili e biologicamente più giovani. Questo rende più semplice la loro espansione in coltura e forse le rende ancora meno immunogeniche di quelle del midollo data la loro immaturità.

Inizialmente ricercate solo nel sangue cordonale, oggi la matrice del cordone o meglio la gelatina di Wharton, sembra essere una fonte migliore visto che solo nel 30% dei campioni di sangue funicolare è possibile isolare le cellule staminali mesenchimali (MSC) (Benirschke K 2006).

Un'altra fonte di cellule staminali fetali (AFS) è il liquido amniotico, che per più decenni è stato usato nella diagnosi prenatale per ottenere uno screening semplice ed affidabile, uno strumento di diagnostica per una varietà di malformazioni congenite e malattie genetiche, come aberrazioni cromosomiche, difetti del tubo neurale o malattie di stoccaggio.

Le cellule del liquido amniotico possono essere ottenute da un piccolo campione di liquido durante la procedura di amniocentesi, una procedura che viene spesso praticata in gravidanze durante il secondo trimestre per diagnosi prenatale o per la determinazione del sesso del nascituro (Hoehn et al., 1975).

Oggi il liquido amniotico può essere utilizzato non solo come strumento diagnostico, ma anche come fonte di cellule staminali multipotenti, capaci di mantenere uno stato indifferenziato con alto grado di proliferazione, e in vitro di differenziarsi in diversi tipi di tessuti provenienti dai tre foglietti embrionali (Giabor J.J. 2011).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Malformazioni congenite così come alcune malattie negli adulti possono essere trattate con tessuti creati da cellule staminali progenitrici isolate dal liquido amniotico.

All'inizio il liquido amniotico è isotonico e contiene proteine, carboidrati, lipidi e fosfolipidi, urea ed elettroliti, successivamente l'urina escretata dal feto ne aumenta il volume e cambia le concentrazioni dei soluti (Bartha et al., 2000). Il feto può respirare nell'acqua, il che permette la corretta crescita e sviluppo dei polmoni e del tratto gastrointestinale. Il liquido deglutito dal feto passa, attraverso il sangue fetale alla circolazione materna. Le funzioni del liquido amniotico sono quelle di assicurare una crescita ed uno sviluppo simmetrico; avvolge e protegge l'embrione attutendone eventuali colpi; mantiene costante la temperatura e la pressione; permette la libertà del movimento fetale, importante per lo sviluppo del sistema muscolo-scheletrico e del flusso sanguigno (Baschat and Hecher, 2004).

Una gran varietà di origini differenti per le cellule presenti nel liquido amniotico sono state sin qui suggerite (Medina-Gomez and del Valle, 1988). E' noto come siano presenti cellule provenienti da ciascuno dei tre foglietti (In 't Anker et al., 2003; Prusa et al., 2003), si ipotizza che queste cellule provengano dall'amnion, dalla pelle o dai tratti respiratori, alimentari, urogenitali.

Inoltre è stato riportato come cellule isolate dal liquido amniotico così come dalla placenta, poste in coltura, possano costituire una riserva di cellule staminali, dato che mantengono la capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari (Prusa and Hengstschlager, 2002).

Mentre i ricercatori sono stati in grado sinora di isolare e differenziare cellule staminali mesenchimali MSCs solo dal 30% dei cordoni ombelicali, i dati in letteratura parlano di come questa percentuale salga a quasi il 100% per quel che riguarda le MSC da liquido amniotico (In 't Anker et al., 2003; Tsai et al., 2004). Una subpopolazione di cellule pluripotenti del liquido amniotico può essere isolata attraverso la selezione delle cellule positive per il marker ckit, un recettore di membrana (De Coppi et al., 2007). Queste cellule, una volta adese, acquisiscono una morfologia allungata e proliferano molto velocemente senza bisogno dello stroma, mostrano un' alta capacità di auto-rinnovamento e possono essere mantenute in coltura per oltre 300 passaggi, oltrepassando in tal modo il limite di Hayflick di senescenza. Il tempo di divisione cellulare si attesta attorno alle 36 ore, con scarsa variazione nel progredire dei passaggi. Studi condotti sul loro cariotipo hanno rivelato che questo è normale anche in

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

cellule che rimangono in coltura per molto tempo, così come normali sono anche i punti di controllo del ciclo cellulare in fase G1 e G2.

Inoltre esse conservano inalterata la lunghezza del telomero qualora vengano mantenute nello stadio indifferenziato (Bryan et al., 1998).

L'analisi del loro profilo fenotipico dimostra come le cellule ckit+ isolate dal liquido amniotico siano positive per un marcatore di superficie specifico delle cellule embrionali, Stage-Specific Embryonic Antigen (SSEA)-4, per il fattore di trascrizione principe delle cellule staminali Oct-4, e non esprimono altri marcatori come SSEA3, CD4, CD8, CD34, per citarne alcuni.

Questo profilo di espressione è di particolare interesse in quanto dimostra la presenza, tra le cellule del liquido amniotico, di progenitori che condividono alcuni marcatori chiave espressi dalle cellule ES. Questo può indurre a concludere che, nonostante le cellule staminali del liquido amniotico non siano così primitive come le cellule ES, tuttavia mantengono un potenziale differenziativo più ampio rispetto alle cellule staminali adulte. Altre due caratteristiche peculiari sono la loro capacità di formare in vitro corpi embrioidi (Embryoid Bodies, EB), ammassi cellulari tridimensionali che risultano essere poi positivi per marcatori specifici dei tutti e tre i foglietti germinali, e la totale assenza di teratomi nei topi immunodeficienti iniettati con le cellule AFS, caratteristica importante per un eventuale approccio di tipo clinico.

Nell'articolo pubblicato da De Coppi e colleghi (De Coppi et al., 2007), è stata dimostrata la capacità delle cellule AFS di differenziarsi in senso adipogenico, osteogenico, miogenico, endoteliale, neurogenico ed epatico per evidenziare in maniera rigorosa che sono effettivamente cellule staminali pluripotenti ed in grado di auto-rinnovarsi, (Wu and Burgess, 2004), però la capacità delle AFS di differenziare in senso ematopoietico non è ancora stata investigata.

### **1.3.2 c CELLULE STAMINALI ADULTE PROPRIAMENTE DETTE**

A partire dallo sviluppo post-embrionico e durante la normale vita di un organismo, alcuni tessuti del corpo necessitano di un continuo rinnovamento per bilanciare la perdita di cellule che avviene fisiologicamente o in caso di danno. Il ricambio cellulare e il conseguente equilibrio tra cellule morte e cellule vive va sotto il nome di omeostasi tissutale; è opinione

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

comune che tale omeostasi sia sostenuta dalle Cellule Staminali dell'Adulto (Adult Stem Cell, ASC). Le ASC sono derivati postnatali delle ESC dislocate in tutto il corpo, mantengono la co-espressione di almeno tre dei quattro fattori di trascrizione caratteristici della staminalità (OCT4, Klf4, e SOX2) e presentano un'alta espressione dei trasportatori ABC e della fosfatasi alcalina, mentre il livello di attività della telomerasi non è chiaro. In comune con le ESC, ma a differenza delle cellule somatiche differenziate, le ASC iperesprimono gli intermedi delle proteine filamentose (E-caderina e vimentina) e b-catenina (BCAT). Inoltre, ogni organo ha specifiche ASC che esprimono un insieme di marcatori caratteristici e, similmente alle ESC, una rete equilibrata di marcatori staminali (Alvarez C.V., 2012).

A differenza delle staminali embrionali, sono poche, solitamente raggruppate e localizzate in *nicchie*, per questo è difficile isolarle in gran numero da organi specializzati. Sono tradizionalmente classificate come cellule staminali multipotenti in grado di differenziarsi in un numero limitato di tipi cellulari adulti (Fortier R.A., 2005). Le cellule progenitrici multipotenti adulte (MAPC) tessuto-specifiche risiedono nel midollo osseo, nel sangue periferico, nel cervello, nella cute, nella retina, nel pancreas, nel tratto gastrointestinale, nel fegato, nella milza, nel muscolo scheletrico, nella polpa dentale e nel tessuto adiposo.

A seconda dell'origine mesodermica, ectodermica o endodermica, queste cellule staminali adulte mostrano la potenzialità di differenziarsi in diversi tipi cellulari.

Le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) derivano dal mesoderma ed hanno la capacità di ricostruire l'intero sistema ematopoietico; da esse derivano i progenitori multipotenti, i progenitori oligopotenti e quelli predestinati (indirizzati irreversibilmente verso una precisa linea cellulare e con progressiva limitazione della capacità proliferativa), ed infine la progenie in corso di differenziamento terminale cioè tutti gli elementi corpuscolari del sangue: eritrociti, piastrine, granulociti, monociti e linfociti (B; T; NK). Le HSC sono state riconosciute come cellule staminali nel 1961 (Till J.E., 1961) e sono utilizzate ormai da anni nel trattamento di numerosi disordini ematologici. Possono essere isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico ed esprimono le molecole CD133 e CD34: CD133 è una glicoproteina a cinque domini transmembrana, il cui ligando e la cui funzione non sono ancora stati individuati, mentre CD34 è una glicoproteina transmembranaria a

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

singola catena di 110kDa, espressa da progenitori emopoietici sia della linea linfoide che di quella mieloide ed anche dalle cellule endoteliali.

Di origine mesodermica sono anche le cellule staminali del muscolo scheletrico, dette cellule satellite o mioblasti, sono cellule miogeniche, multinucleate, quiescenti localizzate sulla superficie delle fibre muscolari differenziate in modo terminale, tra il sarcolemma e la membrana basale, caratterizzate da indicatori come M-caderina, Pax3, Pax7, Myf5. Le Pax3 e Pax7 sono fattori di trascrizione che hanno un ruolo essenziale per la migrazione e il differenziamento miogenico delle cellule satellite (Pèault B., 2007). Tali cellule normalmente non si dividono ma fungono da popolazione cellulare di riserva che in seguito a danno muscolare, è in grado di proliferare e ricapitolare il programma di differenziazione muscolare fino a differenziarsi in miofibre, ma in vitro la loro capacità rigenerativa è limitata e insufficiente a livello terapeutico.

Nel muscolo è stato scoperto un altro tipo di cellule staminali, battezzate cellule staminali mioendoteliali (Myoendothelial Stem Cells MDSC), esse esprimono sulla loro superficie proteine marker tipiche sia delle cellule endoteliali, quelle che rivestono la parete interna dei vasi sanguigni, sia delle cellule satellite, CD56, CD34, CD144 sono insomma cellule *ibride*. In vitro, crescono con facilità moltiplicandosi rapidamente, di conseguenza se ne possono ottenere grandi quantità da usare in terapia, possono differenziarsi in muscolo, osso e cartilagine, mentre in vivo danno il loro meglio come fabbrica di cellule muscolari pronte all'uso, con una resa mai vista, di gran lunga superiore a quella ottenuta con le cellule endoteliali o con le cellule satellite.

Trapiantate in topi immunodeficienti e con danni al muscolo scheletrico, infatti, le cellule mioendoteliali hanno prodotto una media di 89 fibre muscolari, contro una media di 9 e 5 rispettivamente ottenute impiantando la stessa quantità di cellule endoteliali o satellite (Zheng B., 2007).

Cellule epiteliali di origine ectodermica ed endodermica sono state identificate nel sistema nervoso, nell'epidermide, nei follicoli dei capelli, nella cornea, nell'epitelio respiratorio e in quello del canale digerente, nel pancreas e nel fegato. Queste cellule rivestono sia superfici interne che esterne e svolgono varie funzioni come la secrezione, l'assorbimento e il mantenimento dell'integrità delle superfici. L'epidermide, ad esempio, contiene, a livello della regione basale, cellule staminali (Epithelial Stem Cells, EpSC) che si differenziano in

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

cheratinociti mentre si muovono verso gli strati più esterni della pelle; sono cellule che hanno una capacità proliferativa transitoria e subiscono un piccolo numero di cicli di divisione all'interno dello strato basale, stimato a 3-5 (Jensen U.B., 1999). Anche a livello del tessuto nervoso ritenuto fino a poco tempo fa incapace di rigenerarsi, sono state identificate cellule staminali (Neural Stem Cells, NSC), nei mammiferi sono state isolate dalla zona subventricolare dell'encefalo e nel giro dentato dell'ippocampo. Esse sono positive per la nestina ed in vitro, oltre che formare neurosfere, sono in grado di differenziarsi sia in neuroni che in cellule della glia (astrociti e oligodendrociti). Nel fegato le cellule staminali residenti sono le cellule ovali (o Liver Progenitor Cells, LPC) che si trovano localizzate nell'epitelio dei canali di Hering, sono cellule bipotenti in quanto possono differenziarsi in epatociti e colangiociti, cellule epiteliali del dotto biliare. Esse risultano positive per OC-2 (Oval Cell 2), OV-6 (rat oval cell marker 6) e per marker caratteristici degli epatoblasti come l' $\alpha$ -fetoproteina, la  $\gamma$ -glutamilttranspeptidasi (Sell S. 2001). Anche le cellule presenti nell'epitelio dell'intestino si rinnovano continuamente grazie alla proliferazione ed al differenziamento di cellule staminali (Intestinal Stem Cells, ISC) individuate nelle cripte di Lieberkuhn (He X.C., 2004).

### 1.3.2d CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Recentemente è stato dimostrato che in diversi tessuti una popolazione di cellule staminali adulte, dette cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSCs), possono essere sottoposte a un destino diverso da quello abitualmente manifestato in condizioni fisiologiche.

Il destino delle cellule staminali mesenchimali non è limitato al tessuto di origine, le cellule staminali isolate dal midollo osseo possono infatti differenziarsi non solo in cellule del sangue, ma anche in epatociti, cardiomiociti e cellule del muscolo scheletrico.

Il midollo osseo è costituito da due settori distinti ma interdipendenti: il sistema ematopoietico e lo stroma. Lo stroma, fatto da tessuto connettivo reticolare, costituisce sì una rete tridimensionale di supporto, ma è soprattutto il microambiente con fattori di crescita e di sviluppo per le cellule coinvolte nella funzione primaria dell'ematopoiesi come HSC, le cellule progenitrici e le cellule a vario stadio di maturazione. La sottopopolazione di cellule costituenti lo stroma midollare (bone marrow stromal cells BMSCs) è costituita da fibroblasti

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



specializzati che producono l'impalcatura del midollo, da cellule adipose che costituiscono il grasso del midollo, osteoblasti indispensabili nella genesi dell'osso, e da cellule endoteliali che costituiscono i vasi sanguigni. Queste cellule derivano dalle cellule staminali mesenchimali che si dispongono in schiere attorno al seno centrale del midollo osseo. Esse sono differenti dalle HSC, sono cellule pluripotenti, di forma stellata, mononucleate, nel numero di 1 ogni  $10^3$  di cellule mononucleate, esprimono una specifica combinazione di molecole di adesione quali CD29, CD44, CD105, CD166, ma non i marker propri delle cellule emopoietiche con capacità transdifferenziativa, proprietà antinfiammatorie /immunomodulanti.

Inoltre, sono proprio le MSC che gestiscono il microambiente della nicchia emopoietica favorendo la presenza delle HSC, stimolando la proliferazione e la formazione di una riserva che le mantiene in uno stato di quiescenza, e la regolazione dei meccanismi che governano il processo differenziativo.

La capacità transdifferenziativa permette loro di differenziarsi in cellule molto specifiche, saltando da un cammino differenziativo ad un altro; se il processo differenziativo normale permette alle MSC di differenziarsi in fibroblasti, condroblasti, adipoblasti e in osteoblasti, ossia cellule di tipo mesodermico, la transdifferenziazione consente alle MSC di differenziarsi anche in neuroni e cellule epiteliali, tipi cellulari ectodermici, in miociti, enterociti e pneumociti, cellule di tipo endodermico. Questa capacità è interessante perché, se per l'estrazione delle cellule staminali o precursori neurali ci vuole un intervento chirurgico, per le MSC è tutto molto più semplice, sono relativamente facili da isolare e differenziare in cellule neuronali, e pertanto possono essere utili per le strategie di ingegneria tissutale rappresentando un'importante alternativa alle cellule embrionali per il trapianto terapeutico e per ristabilire i neuroni danneggiati da diverse patologie (Scintu F., 2006).

In *vitro* le cellule stromali di midollo (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells, BM-MSCs) aderiscono rapidamente e possono quindi essere separate dalle cellule emopoietiche non aderenti mediante lavaggi ripetuti. Con appropriate condizioni colturali (in un terreno classico (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM supplementato solo con siero fetale bovino FBS), si formano distinte colonie, ognuna delle quali derivante da un singolo precursore, inizialmente definito come Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F). I termini CFU-F o fibroblasti stromali di midollo sono stati per lo più abbandonati e sostituiti

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

da altri quali cellule stromali midollari, cellule stromali mesenchimali e cellule progenitrici mesenchimali (Krebsbachl P.H., 1999). Non esiste ancora una nomenclatura univoca, ma tutte le definizioni si riferiscono alle cellule staminali mesenchimali (MSC).

Oltre che nel midollo osseo cellule aderenti con attività proliferativa indipendente dalla densità possono essere ritrovate in numerosi connettivi, come il periostio e la polpa dentale. Il potenziale dei fibroblasti formanti colonie (CFU-F, frequentemente nominate MSC) dai tessuti non emopoietici e dal midollo non sono stati comparati in maniera sistematica, ed in particolare non in test *in vivo*. Le evidenze che si stanno accumulando suggeriscono che le CFU-F da differenti tessuti non siano identiche. Le MSC isolate da polpa dentale, ad esempio, in condizioni di coltura e trapianto identiche a quelle usate per le BM-MSC producono dentina invece che osso (Gronthos 2002). Anziché ad una singola uniforme classe di MSC ubiquitarie, le evidenze indicano l'esistenza di una classe di progenitori clonogenici residenti in diversi tessuti ma dotati di potenzialità tessuto-specifiche.

Queste popolazioni possono essere confrontate a livello di immunofenotipo e di potenziale differenziativo *in vitro*, mentre per estensive indagini *in vivo* saranno necessarie metodiche fini di isolamento prospettico. Gli studi di Bruno Peault e collaboratori sull'isolamento prospettico di periciti vascolari mediante marcatori quali CD146 ed NG2 ed il trapianto *in vivo*, rappresentano importanti eccezioni ed aprono nuovi interessanti scenari. I dati supportano infatti l'ipotesi che le cellule che danno origine alle colture di "MSC" siano nativamente associate alla parete dei vasi ed appartengano ad un subset di cellule perivascolari distribuite a molti livelli nei tessuti. La vastissima distribuzione delle cellule murali, o periciti, potrebbe spiegare perché progenitori multipotenti simili siano distribuiti in una moltitudine di organi.

Il ruolo fisiologico di queste cellule nella rigenerazione e nell'omeostasi dei tessuti rimane comunque ancora da dimostrare formalmente.

L'utilizzo pratico di queste cellule, ampiamente espandibili in coltura fino a numeri *cl clinicamente* rilevanti ed in grado di mantenere a lungo termine il potenziale differenziativo, potrebbe comunque essere immaginabile anche senza dimostrazioni formali di derivazione e di ruolo fisiologico.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Recentemente è stata scoperta una nuova popolazione di cellule staminali nel fegato, le HLSC (Human Liver Stem Cells). Sono distinte dalle cellule ovali sia fenotipicamente che per la loro capacità di autorinnovarsi e dare origine a diversi tipi cellulari.

Esprimono markers mesenchimali (CD 29, CD 73, CD 44, CD 90), albumina, CK 18, alfa fetoproteina, CK 8 (indicazione di un parziale differenziamento nel lineage epatico) vimentina e nestina che sono markers tipici delle cellule staminali. Non esprimono markers di cellule staminali ematopoietiche (CD 34, CD 45, CD 117, CD 133) e markers delle cellule ovali (CD 117, CD 34, c-Kit 19). Si differenziano in epatociti maturi quando coltivati in presenza di GHF (Hepatocyte Growth Factor) e FGF4 (Fibroblast Growth Factor 4), in osteociti e cellule endoteliali, strutture simili alle isole produttrici di insulina.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

## 1.4 SELF-RENEWAL E PLASTICITA'

La popolazione cellulare che costituisce un organo può essere divisa in tre gruppi: (statiche) le cellule somatiche, differenziate, prodotte durante lo sviluppo, che hanno perso anche la minima capacità proliferativa, in un processo di decadimento lento durante la vita adulta; (di transito) cellule prodotte come precursori delle cellule differenziate, hanno chiaramente un periodo di esistenza relativamente breve nell'organo, infatti la loro durata è solitamente determinata mediante un processo di *maturazione suicidio*, durante il quale le cellule perdono la loro capacità proliferativa prima di essere eliminate; (staminali) un tipo di cellule presenti in un microambiente predefinito, con capacità proliferativa estesa e plasticità differenziativa (Evans M.J., 1981) (Lajtha L.G., 1979).

Durante l'età postnatale tutti gli organi e tessuti contengono una popolazione di cellule staminali capaci di rinnovarsi dopo traumi, patologie o invecchiamento. Molti studi sulla plasticità delle cellule staminali hanno modificato il concetto che le cellule staminali seguano un programma di differenziazione intrinseco, predefinito e unidirezionale.

La cellula staminale adulta è una cellula non differenziata, non specializzata, presente in un tessuto differenziato, in grado di rinnovare se stessa e specializzarsi in tutti i tipi cellulari del tessuto da cui origina. Fino a pochi anni fa, non le veniva assegnato il livello di pluripotenza delle cellule staminali embrionali, oggi, invece, si stanno acquisendo risultati che testimoniano anche questa loro potenzialità differenziativa, la *plasticità* evolutiva, non contemplata dai paradigmi standard della biologia evolutiva, e per la quale le cellule risultano essere in grado di assumere delle caratteristiche fenotipiche e funzionali proprie di altri organi o tessuti diversi dal tessuto nel quale risiedono, ma di diversa derivazione embrionale.

In letteratura il concetto di capacità replicativa delle cellule staminali è rappresentato da termini estremi come *immortali, illimitate, capaci di una proliferazione continua*, attributi che però mettono in risalto le potenzialità delle cellule staminali.

In vitro le cellule somatiche hanno un numero limitato di duplicazioni, pari a 80 (population doublings level PDL, numero minimo di duplicazioni a cui una cellula può andare incontro prima di entrare in senescenza), prima di raggiungere l'arresto della proliferazione e la fase irreversibile della senescenza replicativa arrendendosi in fase G1. La capacità proliferativa limitata delle cellule somatiche è contrastata da quella elevata delle cellule staminali che

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

risulta di 160 (population doublings level PDL), senza trasformazioni oncogene, che viene quindi definita illimitata.

La maggiorparte delle informazioni sulle cellule staminali adulte proviene da studi sul sistema emopoietico midollare murino e umano, che provvede di continuo a sostituire giornalmente i miliardi di cellule del sangue periferico. La popolazione cellulare responsabile dell'emopoiesi è organizzata in una struttura gerarchica al cui vertice si trovano le cellule staminali emopoietiche (hematopoietic stem cells, HSC). Da queste derivano i progenitori multipotenti, i progenitori oligopotenti e quelli predestinati (indirizzati irreversibilmente verso una precisa linea cellulare e con progressiva limitazione della capacità proliferativa), ed infine la progenie in corso di differenziamento terminale. Procedendo, quindi, dalle HSC fino alle cellule mature si osservano un aumento del grado di differenziamento ed una diminuzione della capacità di autorinnovamento, della multipotenza e del potenziale proliferativo (Jiang et al., 2002).

Questi studi hanno permesso di definire la cellula staminale come *clonogenica*, cioè capace di un auto-rinnovamento prolungato attraverso divisioni *simmetriche*, responsabili del mantenimento e dell'espansione del compartimento staminale.

La divisione simmetrica o stocastica determina la formazione di due cellule figlie identiche tra loro (*self-renewal*), alternativamente due staminali o due cellule dette di transito o differenzianti (*committed*), che sono differenti dalla cellula madre perché hanno perso la staminalità. Se il numero di questi due tipi di divisione simmetrica è uguale, la quantità di staminali resta costante a prescindere da quante divisioni totali avvengano, secondo un processo di auto-mantenimento.

Il meccanismo della divisione simmetrica rispetto a quella asimmetrica, è vantaggioso perché è flessibile, infatti se delle cellule staminali vengono distrutte, i segnali della loro morte fanno aumentare le divisioni che generano soltanto staminali fino alla sostituzione di quelle distrutte (amplificazione). Raggiunto il numero e l'equilibrio iniziale, le cellule tornano nella condizione di auto-mantenimento.

A volte degli errori di regolazione fanno aumentare il numero delle staminali anche in condizioni ottimali, creando un pericolo per l'integrità del tessuto, ma per bilanciare aumentano temporaneamente i cicli di divisione per produrre soltanto cellule di transito eliminando così l'eccesso di staminali prodotto in precedenza con il ripristino della normalità.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

La cellula staminale deve anche essere in grado di effettuare divisioni “asimmetriche”, in maniera tale che una cellula figlia sia uguale alla madre, mentre l'altra sia una cellula di transito verso uno specifico *pathway* di espressione molecolare.

A questo punto la cellula staminale figlia prende il posto della cellula che l'ha generata, mentre la cellula di transito inizia a migrare verso il luogo dove c'è bisogno di cellule mature e durante questo percorso effettua numerose divisioni. In particolare, il processo di *differenziamento* cellulare indica l'assunzione di nuove caratteristiche morfologiche e funzionali, attraverso l'attivazione di particolari geni e l'inattivazione di altri.

In questo modo a partire da una singola cellula staminale si sono prodotte numerose cellule differenziate che hanno rinnovato i tessuti, e la cellula staminale figlia è stata generata con una sola divisione cellulare rendendo così minima la possibilità di errori di copiatura del codice genetico.

Il processo di divisione asimmetrica è molto efficace ma presenta dei difetti: se per qualche motivo c'è una perdita di staminali, si inceppa il meccanismo con il rischio che non ci sia più la possibilità di produrre un numero sufficiente di cellule mature. Tale divisione non dà la possibilità alle staminali di aumentare di numero, per questo hanno la capacità di affrontare a seconda delle condizioni la divisione simmetrica.

## 1.5 INFLUENZA DEI FATTORI INTERNI O DEL MICROAMBIENTE NEL DIFFERENZIAMENTO O NELL'AUTORIGENERAZIONE

Le attuali conoscenze riguardanti i fattori che controllano la biologia di una cellula staminale, ovvero il *self-renewal*, il mantenimento dello stato indifferenziato e la possibilità di intraprendere divisioni simmetriche o asimmetriche, sono ancora piuttosto limitate. I pathways molecolari delle cellule staminali sono controllati geneticamente ed epigeneticamente, per cui dipendono da meccanismi in grado di accendere o spegnere specifici gruppi di geni. Lo spostamento dell'equilibrio tra staminalità e differenziamento è influenzato da fattori intrinseci ed estrinseci in grado di innescare processi di replicazione ed induzione al differenziamento o al mantenimento della staminalità.

Un concetto particolarmente interessante, ma ancora scarsamente esplorato, è quello della *nicchia* il microambiente fondamentale per preservare la staminalità, mediante interazioni intracellulari, segnali trasmessi dalla matrice extracellulare (Extracellular Matrix, ECM), oppure modulati da specifici fattori solubili. Un esempio dell'importanza della nicchia deriva dalla considerazione che, nel caso di trapianti di cellule staminali neurali NSCs, esse possono proliferare solamente in regioni neurogeniche integrandosi perfettamente nel circuito preesistente, mentre, qualora il trapianto venga effettuato in aree prive di tali proprietà, il self-renewal è inibito ed è promosso un differenziamento gliale (Herrera D.G., 1999). I fattori intrinseci sono componenti interni alla cellula, come ad esempio le proteine regolatorie o proteine del citoscheletro, la cui migrazione non omogenea è responsabile della divisione simmetrica o asimmetrica.

I meccanismi cellulari intrinseci sono regolati dal microambiente che mantiene le cellule staminali e regola la loro funzione nei tessuti. In risposta alle mutevoli esigenze dei tessuti, le cellule staminali subiscono cambiamenti nello stato del ciclo cellulare e nel potenziale di sviluppo durante il corso del tempo, cambiamenti che richiedono programmi diversi nelle diverse fasi della vita.

È generalmente ritenuto che la maggioranza delle cellule staminali siano dormienti nel ciclo cellulare in fase Go e solo a poche cellule in modo casuale sia dato il compito di fornire tutte le cellule necessarie in un determinato momento, per arginare i danni del DNA, permettendo l'integrità genetica delle popolazioni di cellule staminali. Una ridotta funzione delle cellule staminali e della loro capacità rigenerativa avviene nei tessuti durante l'invecchiamento.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

La nicchia delle cellule staminali neurali NSCs, è ricca di fattori solubili che consentono il mantenimento del suo potenziale neurogenico. Nello specifico, le cellule endoteliali producono il Noggin che consente il mantenimento del pool staminale, prevenendo il differenziamento e garantendo la proliferazione delle NSCs (Li W.,2000). Noggin è un potente antagonista del Bone morphogenetic proteins (BMP) che regola il differenziamento neurale.

BMPs appartengono alla super famiglia TGF- $\beta$  che inibisce la crescita cellulare; l'azione di BMP2/BMP4 è mediata da BMPRII/B attraverso i fattori trascrizionali delle Smad 1,5 o 8 assieme alla Smad 4 con un'espressione genica mirata, e l'inibizione diretta della proliferazione. BMP4 è espresso costantemente, mentre l'antagonista Noggin ha un'espressione transitoria, la sua azione sommata e coordinata con quella del Wnt in determinate circostanze prevale su BMP4 per permettere la proliferazione (Li L.2006).

I fattori di crescita (GF) sono polipeptidi che modulano le funzioni cellulari in maniera autocrina, paracrina o endocrina. Un singolo GF può avere effetti su tipi cellulari multipli e può indurre risposte differenti in base al tipo cellulare sul quale agisce; tuttavia una caratteristica fondamentale del sistema di segnalazione è la ridondanza, per cui un fattore di crescita può legare recettori differenti trasducendo il medesimo segnale. I mitogeni EGF (Epidermal Growth Factor) ed FGF (Fibroblast Growth Factor) sono fattori di crescita essenziali per la regolazione del self-renewal e, almeno in vitro, sono capaci di stimolare la proliferazione delle NSCs. Inoltre, l'HGF(Hepatocyte Growth Factor), prodotto da cellule Nestina-positive, provvede al mantenimento delle NSCs (Bonaguidi M.A.,2005). Il PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor), secreto dalle cellule endoteliali della nicchia neurogenica, è stato identificato come un fattore critico per la comunicazione fra il sistema vascolare e le NSCs (Ramirez-Castillejo C.,2006). In particolare, esso inibisce l'espressione del gene pro-neurale Mash-1, mentre determina un incremento dei livelli di SOX-2 e OCT4 degli effettori del pathway di Notch, HES-1 ed HES-5 (Pumiglia K. 2006). Anche le cellule endoteliali rivestono un ruolo molto importante, poiché, secernendo il BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), riescono a *comunicare* con le NSCs, supportando la neurogenesi (Li Q., 2006).

Il self-renewal delle NSCs è promosso anche dal LIF, dal VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e dal PDGF (Platelet-Derived Growth Factor),appositamente secreti dalle

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico



cellule endoteliali. Il sistema vascolare della nicchia partecipa alla secrezione di altri fondamentali fattori, quali l'SCF(Stem Cell Factor) e l'SDF-1 (Stromal Cell-derived Factor-1), anch'essi in grado di modulare il comportamento delle NSCs della nicchia.

I vasi sanguigni esprimono sia la laminina che il collagene IV, due importantissimi componenti della matrice extracellulare, che possono sia influenzare l'adesione cellulare che modulare specifici pathways, in modo da conferire alla nicchia le sue specifiche proprietà (Goldberg J.S., 2009).

Tra i fattori estrinseci sono di particolare rilievo alcuni fattori appartenenti alla famiglia Wnt e TGF- $\beta$ , Noth, BMI1 e Shh, secreti dal microambiente, le molecole di adesione come le Integrine e il complesso di adesione costituito dalla  $\beta$ -catenina, e la Caderina responsabili delle interazioni cellule-cellula e cellula-matrice extracellulare fondamentali per il mantenimento della staminalità che hanno la stessa azione in quasi tutte le nicchie delle staminali.

L'integrina è necessaria per la migrazione delle cellule staminali, come evidenziato nei sistemi ematopoietico e neurali (Andressen C.,1998), tale proteina è stata anche evidenziata nella migrazione delle cellule tumorali e delle metastasi ( Hirsch E.,1996).

Specifici segnali provenienti dal microambiente possono dunque modulare propriamente il self-renewal ed il differenziamento, promuovendo o disattivando importantissimi pathway, fra i quali spiccano principalmente quelli governati da Wnt, Sonic hedgehog e Notch.

Il pathway di *Wnt* è altamente conservato in tutto il regno animale ed è essenziale nei processi di embriogenesi, carcinogenesi, differenziamento, definizione della polarità cellulare, migrazione, apoptosi ma anche per la regolazione dei normali processi fisiologici che garantiscono la funzionalità della cellula nell'adulto.

Infatti la deplezione di una delle principali componenti di tale pathway, la  $\beta$ -catenina, determina un differenziamento precoce, mentre l'espressione della sua forma attivata incrementa significativamente la popolazione di cellule staminali (Zechner D., 2003).

È, quindi, ragionevole proporre la  $\beta$ -catenina come molecola chiave che funziona da ponte per lo stato attivo o inattivo delle cellule staminali (Fuchs E., 2004): stato inattivo quando le cellule staminali sono legate alla nicchia attraverso interazione con il complesso di adesione caderina- $\beta$ catenina e lo stato attivato in cui  $\beta$ -catenina è localizzata a livello nucleare.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Artefice della regolazione dell'intero pathway è appunto la proteina multifunzionale  $\beta$ -catenina, responsabile non solo della stabilizzazione del citoscheletro e delle giunzioni intercellulari, ma anche dell'attivazione di questa importante cascata del segnale.

Le proteine codificate dai geni Wnt sono lipoproteine palmitoilate che fungono da ligandi per il recettore Fz (Frizzled), attivando così una serie di fenomeni a valle.

In assenza di tale interazione, la forma citoplasmatica della  $\beta$ -catenina viene fosforilata grazie all'azione specifica del macro-complesso Axina/APC/GSK3 $\beta$ /CK1a, per poi essere riconosciuta dall'ubiquitin ligasi  $\beta$ -TrcP ed essere sottoposta a degradazione ubiquitina dipendente. Quando il pathway di Wnt è invece attivo, il recettore Fz, recluta a sua volta l'effettore citoplasmatico Dvl (Dishevelled). In seguito a fosforilazione, Lrp lega l'Axina, impedendo dunque la fosforilazione e la conseguente degradazione

della  $\beta$ -catenina, la quale si addensa attorno al nucleo, per essere poi traslocata al suo interno e stimolare la trascrizione dei suoi geni target come Fibronectin, cMyc (Hoover B.A., 2005).

Il pathway di Wnt promuove il self-renewal anche a livello post-natale, mediante la diretta attivazione della ciclina D e dei fattori SOX-2 e Rest (Repressor Element 1-Silencing Transcription factor) (Takemoto T., 2006), favorendo dunque il self-renewal. Tuttavia, durante lo sviluppo corticale, Wnt è essenziale per indurre il differenziamento neuronale, stimolando l'espressione del gene proneuronale Neurogenina 1 (Ngn1) (Hirabayashi Y. 2004). Esiste quindi una duplice e contrapposta funzione del pathway di Wnt: durante le fasi iniziali dello sviluppo promuove il self-renewal e la proliferazione, mentre successivamente stimola il differenziamento neuronale. Risulta dunque fondamentale identificare quei fattori esogeni od endogeni alla cellula che siano in grado di stabilire l'intorno idoneo, affinché Wnt espleti l'una o l'altra funzione.

Il *signaling di Sonic hedgehog* (Shh) riveste una notevole importanza nella regolazione della proliferazione cellulare, del differenziamento e particolarmente del self-renewal.

Durante lo sviluppo, determina l'asimmetria destra/sinistra e consente la corretta formazione dello scheletro, degli arti, della muscolatura, della pelle, degli occhi, dei polmoni, dei denti, del sistema nervoso e dell'intestino. Nell'organismo adulto, invece, tale pathway garantisce la sopravvivenza del limitato pool di cellule staminali, eventualmente intervenendo nella rigenerazione e nel riparo tissutale (Heretsch P.,2010). Tuttavia, al fine di poter proficuamente attivare lo specifico segnale, è necessario che Shh subisca specifiche modificazioni

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

postraduzionali e, così maturata, venga secreta dalla proteina Dispatched (Disp) e sia libera di interagire con le proteine transmembrana Patched (Ptch). Le diverse componenti del pathway di Shh sono molto abbondanti nelle ciglia cellulari, ossia in quelle proiezioni della membrana cellulare presenti negli eucarioti, in genere in singola copia, coinvolte nella captazione di segnali chimico-fisici e nella comunicazione.

Smoothened (Smo), un altro elemento chiave nella propagazione del signaling di Shh, è presente nella cellula in tre diversi stati: SmoA (una forma inattiva internalizzata), SmoB (una variante in equilibrio con una forma inattiva legata alle ciglia cellulari) e SmoC (la vera e propria forma attiva derivante da SmoB). Alla base del ciglio primario della cellula, Ptch inibisce la conversione di SmoB in SmoC. L'indisponibilità della forma attiva di Smo determina il processamento proteolitico dei fattori trascrizionali della famiglia Gli. Differentemente, in seguito all'interazione con Shh, Ptch trasloca esternamente dal ciglio primario e subisce una degradazione lisosomale. A questo punto, Smo si converte nella forma attivata SmoC e, inibendo la PKA, CK1 e GSK3B, previene la degradazione di Gli. In seguito, la forma attiva di tale fattore trascrizionale trasloca nel nucleo promuovendo la trascrizione dei principali Shh-responsive genes come TBX, BMP, Hoxd (Garg A., et al., 2001) (Heretsch P., 2010).

Un altro importantissimo pathway nell'ambito è quello di *Notch*, fondamentale per la definizione del fate della cellula ed altamente conservato in tutti gli organismi multicellulari. La cascata del segnale generata dall'interazione fra Notch ed i suoi ligandi è responsabile delle più importanti funzioni biologiche, quali l'apoptosi, la proliferazione, il differenziamento, lo sviluppo embrionale, l'organogenesi e l'omeostasi dei tessuti adulti dotati della proprietà di self-renewal. I principali protagonisti del pathway di Notch sono espressi già a livello embrionale, così come nelle cellule staminali adulte. Durante lo sviluppo, Notch preserva l'identità staminale, prevenendo il prematuro differenziamento. Le alterazioni funzionali dei ligandi di Notch, del recettore e dei suoi effettori finali sono connesse all'impoverimento del pool dei progenitori staminali che culmina con un differenziamento precoce (Borggreffe T., 2009).

La *regolazione epigenetica* è di fondamentale importanza nell'indirizzare una cellula staminale verso un determinato destino. Si definiscono epigenetici quei meccanismi cellulari

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

che producono effetti persistenti nel sistema biologico, senza comunque alterare la sequenza genomica. L'epigenetica consente dunque la modulazione dell'espressione del DNA o di strutture ad esso associate mediante particolari processi, quali ad esempio la metilazione del DNA e l'associata azione delle Methyl Binding Proteins (MBDs), la modificazione degli istoni con le proteine appartenenti al Polycomb Group (PcG) e al Trithorax Group (TrxG), il rimodellamento cromatinico o i meccanismi di attivazione trascrizionale a "feedback".

Nello specifico, dei segnali extra- o intra- cellulari possono andare a stimolare specifici "propagatori" di segnale interni alla cellula, i quali, dopo aver attivato determinati pathways, producono effetti durevoli nel tempo, pur non avendo alterato in alcun modo la sequenza genomica.

In particolare le proteine PcG rivestono un ruolo essenziale nella repressione di geni differenziativi, come testimonia il fatto che i nucleosomi in corrispondenza dei principali geni dello sviluppo sono trimetilati a livello della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27) proprio per merito di Bmi-1, membro del Polycomb Repressor Complex (PRCs). Antagonisti del PcG sono le proteine del TrxG, in grado di attivare gli stessi loci silenziati dal polycomb group, mediante la catalisi della metilazione sulla lisina 4 dell'istone 3 (H3K4). Bmi1 è in grado di preservare il self-renewal regolando la metilazione del target H3K27 (Ma et al., 2010). Durante il differenziamento le cellule staminali perdono la loro principale caratteristica, rendendo inaccessibili quei fattori trascrizionali che governano la pluripotenza, ma attivano specifici loci genici che promuovono il differenziamento. Nella prima fase di transizione, l'espressione della demetilasi specifica per l'H3K27 (KDM6B) viene indotta, determinando la rimozione dei gruppi trimetilici dai promotori dei geni del differenziamento. Alcuni geni che rivestono un'importante funzione nei processi differenziativi terminali, vengono trimetilati sull'H3K27 e dimetilati sull'H3K4 durante i primi atti del differenziamento, per essere poi demetilati sull'H3K27 durante la maturazione finale.

Oltre alla metilazione e alla modificazione istonica, esistono dei loop a feedback "auto-sostentante" mediati da specifici fattori trascrizionali che operano un ruolo chiave nel mantenimento delle cellule staminali adulte. Ad esempio, il fattore trascrizionale SOX-2, altamente espresso è in grado di interagire con numerosi target a livello genomico, fra i quali il suo stesso promotore, in modo da costituire un loop a feedback, tale da consentire la sua

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

autoregolazione. Inoltre, SOX-2 promuove l'incremento dei livelli dell'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), il quale, a sua volta, determina l'incremento dell'espressione di SOX-2.

Il programma genetico di divisione del self-renewal, che permette alle staminali di non differenziarsi o morire, coinvolge reti che bilanciano i proto-oncogeni (che promuovono l'autorinnovo), come BMI1 che inibisce l'apoptosi attiva la proliferazione down regolando rispettivamente p19arf e p16INK4a, e i soppressori tumorali (che limitano l'autorinnovo mantenendo l'integrità genomica), come Bcl2 e p21 che impediscono il loro ingresso nel ciclo cellulare e l'apoptosi, mantenendole in uno stato di quiescenza (Pazianos G., 2003).

L'ipotesi che la nicchia ha il ruolo fondamentale nel prevenire la tumorigenesi controllando la proliferazione delle cellule staminali, e che una deregolazione da parte della nicchia determina la proliferazione incontrollata delle cellule staminali con formazione di tumori, è stata provata da Dickson's R. che ha evidenziato nel suo lavoro come la deregolazione da parte della nicchia sulle cellule staminali della ghiandola mammaria ha determinato una anomala espressione di TFF $\alpha$  con conseguente sviluppo del cancro al seno (Chepko G., 2005).

## 1.6 CELLULE SOMATICHE: FIBROBLASTI

I fibroblasti sono le cellule tipiche più numerose e diffuse in tutto il tessuto connettivo, si riconoscono, quando sono attivi, per il nucleo voluminoso e ovoidale, il citoplasma vacuolizzato e per l'abbondante reticolo endoplasmatico, mentre quando sono inattivi si presentano piccoli, allungati con il reticolo endoplasmatico ridotto. In condizioni fisiologiche, i fibroblasti sono cellule relativamente quiescenti a lunga vita. Hanno il compito di mantenere l'integrità e l'omeostasi del tessuto connettivo mediante ricambio degli elementi extracellulari (sostanza fondamentale e fibre) della matrice extracellulare (ECM), sintetizzando collagene di tipo I, II e IV, glicosaminoglicano, fibre elastiche, reticolari, e le glicoproteine, regolandone il normale turnover, attraverso il controllo del differenziamento epiteliale e dell'infiammazione. I fibroblasti inoltre, contribuiscono alla formazione delle membrane basali, attraverso la secrezione di collagene di tipo IV e laminina, e sono importanti per la sintesi di proteasi come la metalloproteasi (MMPs), essenziali per la degradazione e il rinnovamento della matrice (Kalluri, R., 2006). I fibroblasti sono infine coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi dei vicini epitelii, attraverso la secrezione di fattori di crescita e interazioni dirette tra cellule mesenchimali ed epiteliali (Darby, I.A., 2007).

La matrice extracellulare è composta dalla sostanza fondamentale e dalle fibre; la prima è una matrice amorfa e gelatinosa di glicosaminoglicani (lunghi polimeri lineari di unità formate da due zuccheri solforati, l'acido ialuronico è un'eccezione perché non è solforato) di proteoglicani (formati da un asse proteico sul quale si legano i glicosaminoglicani) e di glicoproteine (proteine localizzate nella membrana basale come la laminina, o sparse nella matrice come la fibronectina). Le fibre possono essere di tre tipi, di collagene, elastiche e reticolari. Le prime sono costituite da singole unità definite fibrille di collagene (spesse circa 800-1000 Å) disposte parallelamente fra di loro (unite con legami stabili, che danno rigidità alla molecola) a formare lunghi fasci senza fondersi, che costituiscono la fibra; (Kuzan A, 2012) le seconde sono costituite da una porzione amorfa proteica (elastina) che tiene assieme la parte fibrillare formando delle strutture lunghe che si fondono assieme nelle membrane elastiche, la cui elasticità deriva dalla presenza di un particolare complesso amminoacidico detto desmosina; le terze sono anch'esse formate da collagene ma sono meno spesse e hanno una disposizione a plesso (cioè come elementi allungati che si associano a formare una rete, nei punti di incrocio non vi è fusione) (Kliemt S, 2012).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Le proteine della sostanza fondamentale collegano le cellule, presenti nella matrice extracellulare, alle fibre, la fibronectina attraverso il legame con specifici recettori transmembrana (che nella sua porzione citoplasmatica è unito alla Talina, che a sua volta è unita alla Vinculina, legata ai filamenti di actina del citoscheletro) fa da ponte tra i proteoglicani che sono uniti alle fibre collagene, e il citoscheletro.

I fibroblasti hanno un ruolo prominente nei normali fenomeni di riparazione tissutale (Darby, I.A., 2007). Durante questi processi, si osserva la conversione del fibroblasto dalla sua condizione di cellula quiescente a un fenotipo attivato che esprime  $\alpha$ -smooth-muscle actin ( $\alpha$ -SMA), denominato *miofibroblasto*, e caratterizzato da un'attiva proliferazione e secrezione di livelli elevati di proteine della ECM. I fibroblasti attivati rilasciano livelli aumentati di MMPs (in particolare MMP2, MMP3 e MMP9), i quali favoriscono un rapido turnover dell'ECM, determinandone in alcuni casi cambiamenti nella sua composizione, e mostrano un'aumentata sintesi di fattori di crescita, come HGF, IGF, NGF, EGF, FGF2 e WNT1, che stimolano la proliferazione degli epitelii adiacenti. I miofibroblasti possono inoltre modulare la risposta immunitaria successiva a un danno tissutale, attraverso la secrezione di citochine e chemochine, come interleuchina-1 e MCP1 (Kalluri, R., 2006).

A seguito della loro attivazione, i miofibroblasti invadono la sede della lesione del tessuto, producono ECM che funge da supporto per altri tipi cellulari, i quali possiedono elementi citoscheletrici che favoriscono la contrazione nella cicatrizzazione delle ferite (Tomasek, J.J., 2002).

Il normale processo di riparazione tissutale è un fenomeno autolimitante, che vede la riconversione dei miofibroblasti a una condizione di quiescenza, o la loro eliminazione attraverso meccanismi di apoptosi (Desmouliere, A., 1995).

I fibroblasti dermici sono cellule che si ottengono da una biopsia cutanea, un frammento di cute, che il dermatologo preleva in anestesia locale, in genere dall'avambraccio, utilizzando un bisturi a lama circolare detto *punch*. Il bisturi riesce a tagliare sufficientemente in profondità per ottenere un frammento cutaneo, che è formato da tre componenti principali:

- uno strato corneo, più esterno, composto da cellule di sfaldamento, che protegge la superficie corporea dagli agenti nocivi provenienti dall'ambiente esterno;
- l'epidermide, formata da cellule dette cheratinociti, che si uniscono strettamente tra loro e con la porzione sottostante di tessuto;

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

- il derma sottocutaneo, molto vascolarizzato e formato da una componente proteica e da una componente cellulare. Nel derma risiedono molti tipi di cellule, tra cui i fibroblasti, che sono le cellule deputate a produrre le proteine del derma, organizzate in una rete fibrillare che costituisce la matrice extracellulare del tessuto connettivo dermico. La ECM conferisce al tessuto la struttura, l'elasticità e la necessaria resistenza alle forze di trazione e di pressione.

Dal derma, opportunamente frammentato in condizioni di sterilità, si ottengono porzioni di tessuto dai quali, in particolari condizioni di coltura, si possono isolare i fibroblasti dermici.

Dopo circa 2 settimane (tempo variabile, influenzato da fattori come l'età del donatore), compaiono in coltura i primi fibroblasti dalla morfologia allungata e fusiforme, che duplicandosi formano un monostrato cellulare confluyente, la coltura primaria di fibroblasti che possono essere utilizzati per le sperimentazioni in vitro (Hinz B., 2007).



## 1.7 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (IPS)

La possibilità di *riprogrammare* in modo diretto cellule adulte e specializzate come i fibroblasti, in cellule immature e pluripotenti, le *cellule staminali pluripotenti indotte* (iPSCs), capaci cioè di trasformarsi per sviluppare qualunque tessuto del corpo umano, offre un'opportunità unica per ottenere cellule staminali con potenziali applicazioni in terapia rigenerativa, direttamente dal paziente senza conseguenti condizioni di rigetto e senza preoccupazioni di ordine etico.

La scoperta del ricercatore britannico John Gurdon nel 1962 ha completamente rivoluzionato le teorie preesistenti sulla specializzazione cellulare. Ora sappiamo che le cellule adulte non devono necessariamente essere confinate per sempre alla specializzazione raggiunta, ma possono essere riprogrammate, con enormi benefici per lo studio e lo sviluppo di nuovi metodi diagnostici e terapeutici di moltissime patologie (Gurdon J.B. 1962).

È stato l'obiettivo di tutti i ricercatori impegnati a studiare le cellule staminali: riuscire a riprogrammare quelle già differenziate in *cellule bambine*, per indirizzarle verso qualunque fenotipo cellulare di tessuto o organo. Grazie agli studi di Gurdon e del Professore giapponese Shinya Yamanaka, vincitori del premio Nobel per la medicina 2012, l'obiettivo è quasi raggiunto al punto che le loro scoperte hanno portato alla riscrittura dei libri di testo aprendo nuovi filoni di ricerca nel campo della medicina rigenerativa.

Come ha dichiarato il Comitato della comunità scientifica internazionale «*Con la riprogrammazione delle cellule umane gli scienziati hanno creato nuove opportunità di studio delle malattie e di sviluppo dei metodi per la diagnosi e la terapia*».

Il Dott. Gurdon, che dirige a Cambridge l'istituto che porta il suo nome, ha dimostrato nel 1962 che il processo del differenziamento delle cellule staminali in cellule somatiche è un processo reversibile. Nel corso di un esperimento sostituì il nucleo di una cellula uovo immatura di rana con il nucleo di una cellula intestinale adulta specializzata, la cellula uovo anche se modificata si sviluppò e divenne un normale girino. Lo scienziato aveva trovato la prova che il Dna di una cellula matura ha tutte le informazioni necessarie per dare vita a tutti gli altri tipi cellulari (Gurdon J.B. 1962).

Oltre 40 anni dopo, nel 2006, Yamanaka dimostra che, a partire da 24 geni che codificano per fattori di trascrizione, solo quattro sono i geni specifici della pluripotenza (Oct4, Sox2, c-Myc, klf4) introdotti con vettori retro-virali, in grado di riprogrammare il genoma di cellule

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

specializzate, come i fibroblasti embrionali murini (MEFs) o adulti (MAFs), e di farle così ritornare a uno stadio embrionale con le condizioni di coltura delle cellule staminali embrionali, ottenendo la possibilità di generare tutti i tipi cellulari presenti all'interno dell'organismo.

I fattori di trascrizione della staminalità come Oct3/4 e Sox2 sono essenziali per la generazione di cellule iPS, inaspettatamente, Nanog è superfluo. I fattori che vengono up regolati nei tumori come Stat3, E-Ras, cMyc, Klf4 e  $\beta$ -catenina danno un contributo per il mantenimento a lungo termine del fenotipo staminale e spingono a proliferare le cellule embrionali in coltura, ma solo c-Myc, e Klf4 sono i fattori essenziali che non potrebbero essere sostituiti dagli altri oncogeni Stat3, E-Ras, e  $\beta$ -catenina (Yamanaka S.2006).

La proteina c-Myc ha molti bersagli a valle che possono migliorare la proliferazione e la trasformazione e quindi svolgere un ruolo nella generazione di cellule iPS. Esso infatti si associa con il complesso dell'istone acetiltrasferasi (HAT), tra cui svolgono un ruolo predominante la CREB binding protein (CBP), e il suo stretto omologo p300. Le HAT agiscono trasferendo un gruppo acetile da una molecola di Acetil-CoA ad un residuo di lisina presente all'N-terminale degli istoni; questa modificazione è in grado di indebolire l'interazione tra l'istone e il DNA a causa dell'introduzione di una carica negativa sulla coda basica dell'istone, facilitando l'interazione coi fattori di trascrizione e permettendo così a Oct3/4 e Sox2 di legarsi ai loro loci target specifici (Guo J,2009).

All'interno del genoma dei mammiferi vi possono essere fino a 25.000 siti c-Myc vincolanti molto di più rispetto al numero di siti di legame previsti per Oct3/4 e Sox2. Klf4 ha dimostrato di reprimere direttamente p53, la quale inibisce la trascrizione di Nanog durante il differenziamento delle cellule ES, le cellule iPS hanno mostrato livelli di proteina p53 inferiori a quelli in MEFs, così Klf4 potrebbe contribuire all'attivazione di Nanog e altri geni specifici delle cellule ES attraverso la repressione di p53. È importante, per la generazione di cellule iPS, l'equilibrio tra c-Myc e Klf4 perché Klf4 reprime p53 e permette a c-Myc di inibire l'apoptosi. D'altra parte, Klf4 attiva p21<sup>CIP1</sup>, sopprimendo la proliferazione cellulare, questo effetto antiproliferativo di Klf4 può essere però inibito da c-Myc, che sopprime l'espressione di p21<sup>CIP1</sup> (Sridharan R., 2009).

La resa delle iPS ottenute dal Prof. Yamanaka con il sistema di espressione retrovirale è molto bassa, solo una piccola porzione di cellule che esprimono i quattro fattori diventa cellule iPS.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Ci sono varie ipotesi per tale risultato:

- erano rare le cellule staminali /progenitrici tessuto specifiche, che coesistevano nelle culture di fibroblasti che avrebbero potuto dare uno stimolo per la formazione delle cellule iPS; infatti, le cellule staminali multipotenti isolate dalla pelle di topo sono solo lo 0,067% delle cellule della pelle, tuttavia, anche in cellule derivate dallo stroma del midollo osseo, il quale è più ricco in cellule staminali mesenchimali multipotenti ed altri cellule, l'efficienza è relativamente bassa;
- un'altra spiegazione per la bassa frequenza di derivazione delle cellule iPS è che i quattro fattori possono trasformare anche le cellule staminali presenti, questi risultati indicano che le cellule staminali multipotenti tessuto specifiche non sono favorevoli all'origine delle cellule iPS;
- i livelli dei quattro fattori necessari per la generazione di cellule pluripotenti possono avere delle gamme strette, e solo una piccola porzione di cellule esprimenti tutti e quattro i fattori ai giusti livelli può acquisire le proprietà simili alle cellule ES. Coerentemente con questa idea, un semplice 50% di aumento o diminuzione di Oct3 / 4 induce la differenziazione delle cellule ES, inoltre i livelli di RNA nelle iPS evidenziano la sovraespressione dei quattro fattori, ma i livelli delle proteine sono paragonabili a quelli delle ES, suggerendo che i cloni iPS possiedono un meccanismo (o meccanismi) che regola ermeticamente i livelli proteici dei quattro fattori;
- l'elevato livello dei quattro fattori è necessario nella fase iniziale della generazione di cellule iPS, ma, una volta acquisito lo stato di ES alveolare, i livelli troppo elevati dei quattro fattori sono dannosi per l'auto-rinnovamento e solo una piccola parte delle cellule trasdotte mostra un'espressione appropriata dei transgeni;
- la generazione di cellule pluripotenti possono richiedere ulteriori modificazioni cromosomiche, che avvengono spontaneamente durante la vita in coltura o sono indotte da alcuni dei quattro fattori. Anche se i cloni iPS hanno in gran parte un cariotipo normale non si può escludere l'esistenza di lievi alterazioni cromosomiche;
- l'inserimento retrovirale Sito-specifico può aver causato il silenziamento di alcuni geni o la fusione con i geni endogeni (Takahashi K., Yamanaka S. 2006).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Nel 2007 Yamanaka dimostra che le iP<sub>S</sub> si possono ottenere anche partendo da cellule somatiche umane adulte (fibroblasti dermici umani HDF) ottimizzando la trasduzione retrovirale dei quattro fattori Oct3/4, Sox2, Klf4, e c-Myc, e delle condizioni di cultura successive, per poi farle differenziare in cellule neuronali, cardiache.

Questi sforzi hanno permesso di generare iP<sub>S</sub> che sono paragonabili a ES umane nel loro potenziale di differenziazione in vitro, nella formazione di teratoma, nella morfologia, nel grado di proliferazione, nei marcatori di superficie, nell'espressione genica e nell'attività della telomerasi (Yu J., Thomson J.A. 2007).

Dopo che i HDF diventano iP<sub>S</sub> i quattro geni introdotti con i vettori virali sono stati silenziati per conoscere il loro ruolo anche dopo la riprogrammazione, evidenziando che le iP<sub>S</sub> sono riprogrammate efficientemente e non dipendono in modo continuo dall'espressione dei transgeni per l'autorinnovamento (Brambrink T., 2008). Le iP<sub>S</sub> umane sono diverse dalle iP<sub>S</sub> murine in molti aspetti: le colonie di cellule hES sono più piatte e non si escludono a vicenda, per l'autorinnovamento dipendono dal bFGF, mentre BMP ne induce il differenziamento, quelle murine invece dipendono dal pathway LIF/Stat3 e BMP per l'autorinnovamento.

Nonostante queste differenze, i dati ottenuti da Yamanaka mostrano che gli stessi quattro fattori di trascrizione inducono la riprogrammazione in iP<sub>S</sub> sia nelle cellule umane che in quelle murine. I quattro fattori, tuttavia, non possono indurre cellule iP<sub>S</sub> umane se i fibroblasti dopo la trasduzione retrovirale sono sottoposti alle condizioni di coltura delle cellule staminali embrionali murine. Questi dati suggeriscono che la rete trascrizionale fondamentale, che governa la pluripotenza, è comune in cellule umane e murine, ma i fattori e i segnali estrinseci di mantenimento della pluripotenza sono unici per ciascuna specie (Stadtfield M., 2008).

I limiti dell'utilizzo delle iP<sub>S</sub> nella clinica sono dovuti all'impiego di vettori che si sono integrati più volte, aumentando il rischio di tumorigenesi, nel caso di cellule murine iP<sub>S</sub> il 20% sviluppa tumori, che sono attribuibili, almeno in parte, alla riattivazione del c-Myc. Decifrare il meccanismo mediante il quale i quattro fattori inducono la pluripotenza nelle cellule somatiche è ancora difficile, questa difficoltà deve essere superata per poter usare le cellule iP<sub>S</sub> umane in terapie (Heffernan C. 2009).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Recenti studi evidenziano che le cellule iPS possono essere generate senza c-Myc, sebbene con minore efficienza, e con metodi non retrovirali per introdurre i rimanenti tre fattori Oct3/4, Sox2, Klf4, come ad esempio gli adenovirus o proteine ricombinanti cellpermeable, ipotesi queste che dovrebbero essere esaminate in studi futuri (Yamanaka S. 2012).

Come nel caso delle cellule iPS murine, solo una piccola parte di fibroblasti umani sono stati riprogrammati in iPS;

da un punto di vista pratico questa efficienza è sufficientemente alta poiché più cloni di cellule iPS possono essere ottenuti da un singolo esperimento, ma dal un punto di vista scientifico, invece, la scarsa efficienza solleva diverse possibilità (Nakagawa M.,2008):

- l'origine delle cellule iPS possono essere le staminali o le cellule progenitrici coesistenti nella coltura dei fibroblasti,
- l'integrazione retrovirale in alcuni loci specifici può essere richiesto per l'induzione delle cellule iPS,
- minori alterazioni genetiche, che non possono essere rilevate dalle analisi del cariotipo, o alterazioni epigenetiche sono necessarie per l'induzione iPS (Takahashi K., Yamanaka S. 2007).

Altri studi son stati fatti per la riprogrammazione cellulare con l'utilizzo di Oct4, Sox2 e, al posto di c-Myc e Klf4 altri fattori come LIN28 e NANOG, che sono sufficienti per riprogrammare cellule somatiche umane in cellule staminali pluripotenti con le caratteristiche essenziali di cellule staminali embrionali (ES). Questi cellule umane pluripotenti indotte hanno un cariotipo normale, l'attività della telomerasi espressa, espresso marcatori della superficie cellulare e geni che caratterizzano le cellule embrionali umane, e mantengono il potenziale di differenziamento in derivati avanzati di tutti e tre i foglietti embrionali primari (Yu J., Thomson J.A. 2007).

Lo studio di Yamanaka ha aperto la strada per generare cellule staminali pluripotenti autologhe, per curare malattie specifiche del paziente, inoltre anche con la presenza di integrazione retrovirale, le cellule iPS umane sono utili per la comprensione dei meccanismi di alcune malattie, per i test tossicologici dei farmaci e di screening (Yamanaka S. 2012).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

## 2 ORIENTAMENTO FENOTIPICO DELLE CELLULE STAMINALI

### 2.1 STIMOLI CHIMICI

La mole di dati accumulati in anni di coltura *in vitro* di cellule primarie è stata una fonte di inestimabile valore per i ricercatori che tentavano di guidare il differenziamento di cellule staminali. Un'ampia varietà di tipi di cellule è stata derivata con successo attraverso il differenziamento *in vitro*, anche se poche sono state poi applicate terapeuticamente (Pain B,1996). Tuttavia, gli studi odierni sembrano poter arrivare a fornire i tipi cellulari più importanti per le nuove terapie delle malattie che costituiscono le principali sfide future. Le combinazioni di fattori di crescita, vitamine e mezzi di coltura specializzati per molti tipi cellulari sono ben documentate e ampiamente utilizzate. Il controllo *in vitro* del differenziamento, soprattutto per quanto riguarda le cellule staminali, ha attinto moltissimo da questa esperienza, così come dagli studi di biologia dello sviluppo sui meccanismi di specializzazione e differenziamento delle cellule (Alvarez C.V.,2012).

Per indurre il differenziamento delle staminali verso particolari linee cellulari specializzate di interesse, son stati utilizzati protocolli specifici per ogni tipi di differenziamento con l'utilizzo di sostanze chimiche che hanno un azione mirata. Il controllo dell'attività dei geni per il differenziamento coinvolgere eventi chimici che avvengono a scale superiori a quella di atomi e molecole, la cosiddetta *mesoscala*, con l'interazione di gruppi e complessi di molecole di grandi dimensioni (Rose L.F.,2001).

I fattori di crescita sono per lo più polipeptidi che svolgono un'importante azione regolatrice, i più utilizzati sono: il fattore di crescita piastrinico (PDGF), il fattore di crescita trasformante beta (TGF-beta), il fattore di crescita insulino simile 1 e 2 (IGF), il fattore di crescita fibroblastico (FGF) e infine le proteine osso morfogenetiche (BMP). Una caratteristica comune a tutti questi fattori di crescita è la loro azione altamente specifica per un particolare tipo di cellula bersaglio che spingono verso un fenotipo preciso. Tra i fattori di crescita, quello di origine piastrinica è sicuramente tra i più studiati e utilizzati per la sua intensa attività mitogena nei confronti di cellule mesenchimali di diversa origine, può essere usato da solo oppure in associazione ad altri fattori di crescita, come l'IGF che agisce prevalentemente sul metabolismo, stimolando la proliferazione cellulare (Rose L.F.,2001).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

L'utilizzo di medium condizionati per il differenziamento osteogenico, con acido ascorbico  $2 \times 10^{-4}$  M e la  $\beta$ -glycerophosphato  $7 \times 10^{-3}$  M, sono i requisiti minimi per il differenziamento osteogenico, con evidente aumento dei livelli dell'espressione del fattore di trascrizione basico helix-loop-helix *Dec1* coinvolto nel differenziamento delle cellule staminali mesenchimali (MSC). L'ormone sintetico glucocorticoide, lo dexamethasone  $1 \times 10^{-8}$  M e la vitamina D3  $2 \times 10^{-3}$  M sono inoltre spesso aggiunti al terreno di coltura per aumentare la resa del differenziamento, così come altri fattori di stimolazione della crescita, come le proteine morfogenetiche ossee conosciute anche come *osteogenine* che hanno come bersaglio specifico, le cellule mesenchimali capaci di differenziarsi in senso condrogenico o osteogenico (D'Ippolito G., 2002) (Iwata T., 2006).

Per il differenziamento condrogenico si utilizza un terreno con dexamethasone e il fattore di crescita transforming growth factor-beta3 (TGF-beta3) che esplica un'attività mitogena preferenziale, anche se ulteriori approfondimenti evidenziano una maggior azione differenziativa con l'aggiunta di tiroxina, concentrazioni basse di dexamethasone, senza TGF-beta3. (Mackay A.M., 1998).

Alcune molecole di segnale come il metabolita biologicamente attivo della vitamina A, l'*acido retinoico*, attivano e modulano complessi eventi morfologici durante lo sviluppo embrionale e mantengono l'omeostasi in processi fisiologici dopo la nascita. L'Acido retinoico (RA) ha un ruolo importante nella proliferazione e nel differenziamento ed è ampiamente utilizzato in vitro per l'orientamento delle cellule staminali. L'acido retinoico è fondamentale nello sviluppo embrionale del sistema nervoso centrale (Shuiliang Yu 2012), degli occhi (Ales Cvekl 2009) (Kastner P., 1996) e del cuore (Sucov H.M., 2004). Le diverse attività biologiche del RA derivano dalla sua capacità di attivare diversi membri della famiglia dei recettori nucleari ormonali non steroidei: i RAR (classical RA receptors) distinti in RAR  $\alpha$ , RAR  $\beta$  e RAR  $\gamma$ , i RXR (retinoid X receptors) presenti in diverse forme RXR  $\alpha$ , RXR  $\beta$ , RXR  $\gamma$  (Germain P., 2006) e i PPAR  $\beta/\delta$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\beta/\delta$ ) (Berry D.C., 2009).

Il legame dell'AR con i recettori avviene tramite le proteine intracellular lipid-binding proteins (iLBPs) che lo trasportano dal citosol al nucleo: la CRABP-II (cellular RA binding protein II) trasporta RA ai recettori RAR, e la FABP5 (fatty acid binding protein type 5) trasporta RA ai recettori PPAR  $\beta/\delta$ .

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Quindi, lo spettro dei geni bersaglio attivato da RA e le relative risposte biologiche sono determinate dall'espressione nelle cellule di queste proteine specifiche di trasporto; infatti RA controlla l'espressione dei geni bersaglio RAR in cellule che mostrano un elevato rapporto CRABP-II/FABP5, mentre regola i geni bersaglio di PPAR  $\beta/\delta$  in cellule in cui tale rapporto è basso. Un'ulteriore proteina è coinvolta nella regolazione dell'azione del AR, la CRABP-I (cellular RA binding protein I), che diminuisce l'azione dell'AR attraverso la sua degradazione.

È stato dimostrato in vitro che RXRs sono in grado di legare il DNA come omodimeri, mentre RARs e PPAR  $\beta/\delta$ , formano eterodimeri con RXR e legano il DNA in modo altamente cooperativo, pertanto, i recettori RXRs hanno un ruolo centrale nel mediare le molteplici vie di segnalazione ormonale, infatti i vari sottotipi di RXR e RAR sono diversamente espressi secondo il modello caratteristico dei tessuti durante il normale sviluppo embrionale (Sucov H.M., 2004).

In condizioni fisiologiche il recettore RAR forma eterodimeri con RXR, in assenza dell'AR l'eterodimero RAR/RXR è legato al corepressore (le proteine NCOR o SMRT) e ai fattori associati (istone deacetilasi HDAC o DNA metil-transferasi) che inibiscono la trascrizione dei geni bersaglio dell'AR condensando la cromatina in una struttura inattiva; in presenza dell'AR che si lega l'eterodimero RAR/RXR cambia conformazione, rilascia il corepressore e lega il coattivatore e i fattori associati (istone acetiltransferasi o metiltransferasi) con riconoscimento di sequenze specifiche del DNA le RAREs (the retinoic acid-response elements) e attivazione della trascrizione dei geni del differenziamento. Nel caso dell'induzione neuronale i geni bersaglio primari sono Hoxa-1, Hoxb-2, Sox6 e Wnt-1, mentre i geni bersaglio indiretti sono Mash-1, NGN-1, NeuroD, N-caderina, e Pbx (Shuiliang Yu 2012). Importante è anche l'azione dei componenti della via alternativa dell'RA, costituita dai recettori PPAR  $\beta/\delta$ , altamente espressi nel cervello embrionale, che quando sono attivati, inducono il differenziamento la trascrizione di ERK1,2 and BDNF e migliorano la maturazione neuronale in modelli cellulari in coltura, esercitando un'azione anti-apoptotica e anti-infiammatoria hanno un effetto neuroprotettivo.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico



Le informazioni disponibili evidenziano che sia RAR che PPAR  $\beta/\delta$  sono coinvolti nel differenziamento neuronale mediato dall'RA, tuttavia, i contributi dei singoli percorsi al processo generale sono poco conosciuti (D'Angelo B., 2011).

L'AR in combinazione con l'insulina porta ad un differenziamento preferenziale, ma non selettivo, in senso adipocitario (Sucov H.M., 2004).

Per il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali verso il fenotipo cardiaco e vascolare è di recente utilizzo un glicocongiugato sintetico, l'HBR un estere misto di acido ialuronico (HA) con acido butirrico (AB) e acido retinoico (AR) che migliora notevolmente l'espressione genica di vari fattori di crescita come VEGF (vascular endothelial growth factor), KDR, HGF (hepatocyte growth factor), che hanno un'azione antiapoptotica, mitogenica e spingono il differenziamento delle cellule staminali in cellule endoteliali. L'HBR induce anche l'aumento della trascrizione dei geni GATA-4 e Nkx-2.5 con un'elevata espressione dei marcatori specifici del fenotipo cardiaco (Ventura C., 2007). Nell'HBR ogni molecola che lo costituisce ha il suo ruolo: l'acido ialuronico disciplina vari eventi cellulari, e si comporta da vettore per l'ingresso dell'glicocongiugato all'interno delle cellule, l'acido butirrico inibisce l'istone deacetilasi HDAC con rilassamento della cromatina, e l'acido retinoico si lega all'eterodimero RAR/RXR a livello nucleare per l'attivazione della trascrizione dei geni del differenziamento (Ventura C., 2004).

*L'acido ialuronico* è un glicosaminoglicano ad alto peso molecolare, il componente principale della matrice extracellulare ed è coinvolto in processi di sviluppo e in diverse attività cellulari come l'adesione, la migrazione, la trasformazione e la proliferazione cellulare, interagisce con altre molecole della matrice extracellulare come l'aggricano e con recettori di membrana, noti come CD44 (Laurent T. C., 1995).

Il recettore CD44 è una proteina transmembrana di tipo 1 formata da quattro domini: un dominio distale extracellulare, sede del legame con acido ialuronico; un dominio prossimale extracellulare, in cui si riscontrano variazioni per splicing alternativo; un dominio transmembrana, modulatore del legame col ligando e un dominio citoplasmatico responsabile dell'interazione con le proteine del citoscheletro non ha un'attività enzimatica intrinseca, né come fosfatasi, né come tirosin chinasi, ma attiva dei segnali intracellulari attraverso il legame con proteine di segnale (Wheatley S.C., 1993).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Il CD44 ha la funzione principale di legare l'HA e di internalizzarlo attraverso la formazione dell'endosoma. Il legame dell'AH con il recettore determina l'attivazione dell'enzima PI3K che, nello stato quiescente, si trova nel citoplasma sotto forma di dimero (p110, la subunità catalitica e p85 la subunità regolatrice) di solito legato al recettore transmembrana, con la subunità p85 che blocca il sito di legame per il fosfatidilinositolo(4,5)difosfato (IP2).

Quando viene attivata la subunità catalitica trasforma il fosfatidilinositolo(4,5)difosfato (IP2) (legato alla membrana citoplasmatica) in fosfatidilinositolo trifosfato (IP3) che fosforila la Akt detta anche PkBo RAC, una ser-tyr chinasi che trasloca nel nucleo e fosforila a sua volta varie proteine, innescando una serie di reazioni rivolte tutte all'aumento della proliferazione ed alla sopravvivenza cellulare (Wheatley1 S.C.,1993).

L'HA interagisce con differenti glicoproteine chiamate *hyaladherins* tra cui la più importante è la HABP1 (HA-binding proteina 1)(Sengupta A.,2004) che influenzano le sue attività biologiche come i legami cellula-cellula e cellula-matrice (Collis L.,1998).

Costituito da una corta catena di acido grasso *l'acido butirrico* rappresenta un potente inibitore dell'istone deacetilasi, con conseguente iperacetilazione degli istoni H3 e H4.

Esso è in grado di indurre la differenziazione cellulare, l'apoptosi e di inibire la crescita di una varietà di cellule; studi condotti per chiarire il meccanismo d'azione hanno dimostrato che AB interferisce con diversi meccanismi cellulari, modulando l'espressione di alcuni oncogeni come c-myc, di alcune proteine legate al ciclo cellulare e di geni che regolano l'apoptosi, come il p53(Coradini et al., 1999).

## 2.2 STIMOLI FISICI

I recenti progressi conseguiti nell'isolamento, manipolazione e coltura delle cellule staminali hanno suggerito il loro possibile utilizzo nella rigenerazione di tessuti ed organi, pur confermando come il loro destino evolutivo sia fortemente regolato da parametri ambientali a causa della loro plasticità, che ne rende difficile il controllo del differenziamento verso un particolare fenotipo (Piscaglia A.C.2008). Al fianco di metodologie convenzionali rappresentate dagli stimoli chimici, vengono ricercate e applicate strategie innovative,

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

metodiche che permettano il controllo del differenziamento e dispositivi capaci di trasmettere alla cellula i segnali necessari per indirizzarle verso il fenotipo di interesse.

I meccanismi che orchestrano lo sviluppo embrionale degli organi, possono essere riprodotti in vitro per cercare di mimare l'ambiente e gli stimoli a cui sono sottoposte le cellule in vivo. Lo sviluppo del cuore è stato studiato con tecniche non invasive per rilevare i campi elettrici interni e le correnti ioniche extracellulari e registrare le loro caratteristiche (intensità, ampiezza e durata), per ottenere dei parametri fisiologici, da utilizzare come guida per applicare gli stessi stimoli elettrici a colture cellulari di cellule staminali ed influenzare il loro differenziamento verso il fenotipo cardiaco (Nuccitelli R. 1992).

Il cuore è la più grande sorgente bioelettrica del corpo, e in vari studi vengono utilizzati sistemi biomimetici per fornire segnali elettrici imitando quelli del cuore, ottenendo lo sviluppo progressivo delle proprietà contrattili caratteristiche del tessuto cardiaco, compresi l'allineamento e accoppiamento cellulare, maggiore ampiezza delle contrazioni e un notevole livello di organizzazione ultrastrutturale. Un importante aspetto della ricerca è l'ottimizzazione dei parametri dello stimolo elettrico da applicare, e lo studio degli effetti della stimolazione su popolazioni di cellule cardiache in monostrato per arrivare ad ottenere la contrazione sincrona (Tandon N., 2009).

Visualizzare il sistema vivente come un'entità elettromagnetica sottolinea la presenza di segnali elettrici e magnetici endogeni che sono indicativi dei livelli di organizzazione dei sistemi viventi e che sono direttamente legati alle funzioni biologiche quali lo sviluppo, la crescita e la riparazione dei tessuti. L'organizzazione degli organismi può essere modellata elettricamente, l'applicazione di campi elettromagnetici, di opportuna intensità e frequenza, da un effetto biologico massimo a specifiche frequenze di stimolazione per il fenomeno della *risonanza*. (Liboff A. R 2004).

Un segnale elettromagnetico molto debole, ma alla giusta frequenza (sintonizzato), può interagire in risonanza con una normale funzione biologica a livello molecolare e supra-molecolare e sviluppare deboli correnti alternate endogene a quella stessa frequenza (Frey A.H., 1993)

Gli effetti dei campi elettromagnetici ed in particolare dei campi a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF ) sui sistemi biologici sembrano dipendere dalle caratteristiche fisiche del segnale, dai parametri di esposizione e dal tipo cellulare, e influenzano i diversi processi

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

biologici intervenendo sulla concentrazione di secondi messaggeri come l'inositolo 3 fosfato (IP3, Inositol triphosphate) (Korz-Sleptsova et al, 1995), sull'omeostasi del calcio (McCreary et al, 2006) sull'espressione genica, sulla proliferazione (Manni et al, 2002), sul differenziamento cellulare (Ventura et al, 2005; Manni et al, 2004) e sulle proprietà dei canali di membrana in virtù delle loro caratteristiche elettriche.

Il trasporto ionico attraverso questi canali è governato non solo da sensori di voltaggio, ma anche da campi elettrici oscillanti, che risultano dalla distribuzione elicoidale degli ossigeni carbonilici che si trovano nelle pareti del canale sul lato luminale. I periodici cambiamenti nella concentrazione ionica associati all'oscillazione dello ione  $Ca^{2+}$  potrebbero essere dovuti alle variazioni nel campo elettrico intracellulare.

Il fenomeno della risonanza avverrebbe quando la cellula viene esposta ad una specifica combinazione di campi magnetici statici deboli e alternati a bassa frequenza che accelerano le molecole e gli ioni in un moto a spirale, per esempio all'interno di un canale di membrana, e questo potrebbe alterare la normale fisiologia elettrochimica della cellula. Tali fenomeni di risonanza potrebbero essere non soltanto la modalità con cui campi magnetici esterni possono interagire con i sistemi biologici, ma la modalità stessa con cui funzionano tanti meccanismi cellulari (Liboff A.R., 1997).

L'azione dei campi magnetici con frequenza estremamente bassa (50Hz, 0,8Trms) sul differenziamento cellulare è stata valutata in colture di cellule staminali embrionali pluripotenti murine (ES) per evidenziare l'espressione di geni che codificano per fattori di trascrizione attivamente trascritti solo in cellule di particolari tessuti come il cuore e se dall'esposizione delle cellule ES a MF possono in ultima analisi derivare linee cellulari specializzate specifiche. I risultati ottenuti evidenziano un'azione non generale sul rimodellamento della cromatina con conseguente espressione genica di particolari fattori di trascrizione come GATA-4, prodynorphin e Nkx-2.5 implicati nella cardiogenesi, e non di geni del differenziamento muscolare scheletrico o neuronale (Ventura et al, 2005).

Questi risultati pongono il problema più generale del ruolo della fisica come possibile strumento per guidare l'orientamento delle cellule staminali e la riprogrammazione delle cellule somatiche verso uno stadio di pluripotenza. L'identificazione di stimoli fisici appropriati e la possibilità teorica di modulare l'esito dei diversi processi differenziativi, cambiando le caratteristiche di un medesimo stimolo (es. ampiezza, durata, intensità e forma

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

di un campo magnetico), introdurrebbero elementi di notevole semplificazione procedurale e risparmio di costi nell'ottica di una futura medicina rigenerativa.

L'uso di campi elettromagnetici è una comune pratica nelle applicazioni mediche per la diagnosi e la cura di diverse patologie.

Il Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC) è un innovativo dispositivo medico, un biostimolatore di ultima generazione utilizzato per migliorare le condizioni neuropsicofisiche di pazienti affetti da disfunzioni del sistema nervoso centrale come l'ansia e la depressione dovute allo stress sociale cronico, e per la rigenerazione di tessuti danneggiati da patologie che intaccano la struttura fisica del tessuto stesso.

Il REAC emette una stimolazione elettromagnetica che produce campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico di 2,4 o 5,8 o 10,5 GHz circa 0,1 mW/m<sup>2</sup>, che dura pochi millisecondi, e rileva tramite l'emettitore gli effetti prodotti dalla interazione tra il campo elettromagnetico prodotto dal corpo umano (~ 30-300 GHz, di circa 3 mW/m<sup>2</sup>) e il campo prodotto dallo strumento. Questa interazione radioelettrica viene ricevuta da una sonda (trasportatore) posto su un punto specifico del corpo del paziente trattato. L'interazione tra il campo elettromagnetico prodotto dal REAC e il corpo del paziente è differente dalle procedure di stimolazione celebrale esogena che utilizzano stimoli magnetici transcraniali (Rinaldi S. 2010). In particolare in questo lavoro di tesi è stato utilizzato un programma di stimolazione REAC-TO per le cellule staminali embrionali di topo e i fibroblasti umani adulti. In questo modo abbiamo potuto valutare gli effetti del REAC sull'espressione di specifici patterns, e spiegare così i successi ottenuti nella pratica clinica.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

### 3. SCOPO

Gli stimoli fisici rappresentano un approccio nuovo e particolarmente interessante per studiare e controllare la plasticità delle cellule staminali (CS), mimando fattori in cui le cellule sono esposte in vivo e quindi modulando l'ambiente di sviluppo, la cosiddetta “*nicchia staminale*” e guidando i complessi processi di adesione, proliferazione e differenziamento verso i fenotipi specifici, di fondamentale importanza nella rigenerazione dei tessuti.

Lo scopo di questo progetto è di definire nuovi strumenti per studiare e controllare la plasticità delle cellule staminali (CS), modulando l'ambiente di sviluppo cellulare tramite segnali fisici.

Gli studi qui riportati hanno voluto investigare se Cellule Staminali Embrionali murine, le R1, sono sensibili all'azione di uno stimolo chimico come l'HBR o a uno stimolo fisico come la Radiofrequenza di 2,4 GHz, nel campo delle microonde con bassa potenza, prodotta dal “Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC)”, un apparato innovativo capace di fornire Radiofrequenze RF nella banda Wi-Fi (Wireless Fidelity).

E hanno voluto inoltre stabilire se tale effetto è stato in grado di influenzare positivamente la comparsa di trascritti capaci di guidare l'orientamento cellulare verso specifici fenotipi, e aumentare la resa dei diversi processi differenziativi, quali la cardiogenesi, la neurogenesi e la miogenesi.

Valutare se la stimolazione del REAC ha fornito un “*ambiente fisico*” per l'ottimizzazione della pluripotenza staminale e il raggiungimento di destini differenziativi è importante per generare cellule disponibili per la Medicina Rigenerativa.

Ma per la terapia cellulare c'è bisogno di cellule autologhe del paziente da curare, quindi sono state sottoposte alla Radiofrequenza di 2,4 GHz secondo un preciso protocollo, cellule somatiche come i fibroblasti cutanei umani ricercando l'opportunità di riprogrammarle in uno stato intermedio di cellula staminale pluripotente indotta, e poi di orientarle verso fenotipi cellulari funzionali, tutto questo senza dover utilizzare agenti chimici o tecniche complesse di ingegneria che richiedono l'uso di vettori virali difficilmente trasferibili in ambito clinico. Questa strategia renderebbe disponibile ad uso clinico cellule derivate dal paziente stesso in grado di integrarsi nel tessuto danneggiato, dopo l'esposizione all'agente fisico per un periodo di tempo limitato.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 ESTERI DI ACIDO IALURONICO E DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE E STAMINALI MESENCHIMALI UMANE

Le cellule staminali embrionali (ES), hanno tutte le potenzialità per differenziare in vitro in vari tipi di cellule compresi i cardiomiociti (Smith A.G.2001) attuando i processi di sviluppo che si verificano in vivo. Inoltre, le cellule ES oltre ad essere uno strumento per studiare i meccanismi molecolari della cardiogenesi, rappresentano una fonte per terapie mirate alla rigenerazione di tessuti danneggiati (Rajasingh J., 2007). Anche se le cellule ES sono pluripotenti, in vitro affrontano spontaneamente il processo del differenziamento verso il fenotipo cardiaco in modo limitato, anche con l'utilizzo di molecole naturali, con una resa bassa di cardiomiociti (Ventura C., Maioli M., 2004).L'utilizzo di nuove molecole come l'HBR che amplificano i normali segnali molecolari che orchestrano il differenziamento, in cellule staminali embrionali e in cellule staminali mesenchimali adulte può offrire dei vantaggi significativi per la riparazione tissutale e per ottenere nuove informazioni su quali meccanismi vengono attivati durante lo sviluppo embrionale.

Il programma cardiogeno indotto da HBR è dovuto all'induzione trascrizionale di due fattori di trascrizione *GATA-4* e *Nkx-2.5* che sono i regolatori dell'orientamento verso il fenotipo cardiaco espressi durante la formazione del cuore (Lints TJ, 1993) (Arceci RJ,1993). HBR aumenta anche l'espressione della *Prodynorphin* e del suo peptide biologicamente attivo, l'agonista del recettore k oppioide, la *DinorfininB*, entrambi direttamente coinvolti nel differenziamento cardiaco (Ventura C, Maioli M. 2000) (Ventura C, 2003).

In questo studio, è stata valutata l'espressione genica e proteica di un'altra famiglia di fattori implicati nel differenziamento cardiaco, le Smad1, 3,4, e 7, in colture di cellule embrionali murine e cellule staminali mesenchimali fetali umane FMhMSCs, sottoposte per periodi di tempo diversi all'azione dell'HBR.

Le proteine Smad sono una famiglia di trasduttori di segnale che può essere suddivisa in tre sottofamiglie distinte: i R-SMADs (receptor-regulated Smad), i Co-SMADs (common-partner Smads) e i I-SMADs (inhibitory Smads) (Attisano L 2000).

Nei vertebrati e nella *Drosophila* i R-SMADs durante lo sviluppo embrionale del cuore, vengono attivati per fosforilazione attraverso la cascata del segnale attivata dal legame al

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

proprio recettore con attività chinasi, della proteina morfogenica ossea (BMP), che fa parte della famiglia del fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ).

Il R-SMADs attivo, recluta i Co-SMADs e i complessi eteromerici formati si accumulano nel nucleo applicando la loro azione sulla trascrizione genica (Massagué J., 2000).

In Drosophila, Smad4 e R-SMADs (Smad1, Smad5, e Smad8), regolano l'espressione genica di Nkx-2.5 tramite un dominio di legame-Smad che si trova nella regione del promotore (Bodmer R 1993).

#### **4.1a PROTOCOLLO DI DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE GTR1 E DELLE FMHMSCS**

Le cellule staminali embrionali murine GTR1 (Ventura C., 2003) derivano dalle cellule staminali embrionali murine R1 per inserzione del gene della resistenza alla puromicina sotto il controllo del promotore del gene cardiomiocita-specifico della catena pesante della miosina (MHC), e sono state gentilmente fornite dal Dr. WL Stanford dell'Università di Toronto e Center for Modeling Human Disease, Canada.

Le GTR1 vengono mantenute in uno stato indifferenziato, coltivandole su un monostrato di fibroblasti embrionali murini mitoticamente inattivi, in presenza di Knockout DMEM contenente 15% di FBS siero fetale bovino, supplementato con Leukemia Inhibitory Factor (LIF) alla concentrazione finale di 1000 U/ml. Prima che si formino i corpi embrioidi (EBS) le cellule ES indifferenziate subconfluenti sono state raccolte per tripsinizzazione, e trasferite su piastre contenenti gelatina allo 0,1%, e coltivate in presenza di knockout D-MEM contenente 15% FBS e il LIF fino alla confluenza del 70%-80%. Per indurre il differenziamento cardiaco le cellule sono state piastrate in piastre speciali (Costar ultra-low attachment clusters), contenenti il terreno di coltura senza il LIF, per permettere la crescita in sospensione e la formazione dei corpi embrioidi. Dopo tre giorni in coltura i corpi embrioidi che si sono formati sono stati divisi in piastre tissue culture. Quando l'attività spontanea dei corpi contrattili è evidente, circa sette giorni dopo aver rimosso il LIF, si aggiunge la puromicina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , per selezionare le cellule che si sono differenziate in cardiomiociti ed eliminare le altre e si lasciano in coltura per altri quattro giorni (Maioli M, 2007).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



FMhMSCs sono state isolate come descritto in Ventura C. 2007, dalla placenta a termine ottenuta da parti cesarei, rapidamente lavata in PBS contenente penicillina e streptomina, sono stati tagliati in piccoli pezzi di tessuto, e digeriti per dieci minuti in DMEM con 0,25% di tripsina, 10 U/ml di Dnase I e 0,1% di collagenasi.

I campioni sono stati spipettati vigorosamente per cinque minuti e trasferiti in una nuova provetta contenente FBS per neutralizzare l'azione degli enzimi, poi centrifugati a 10.000 g per 10 minuti. Ogni pellet è stato risospeso in 5 ml di DMEM contenente 20% FBS, 10 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina e la sospensione cellulare di FMhMSCs è stata seminata in fische T25 e incubato a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule in sospensione sono state rimosse dopo 1 settimana e il terreno di coltura (con 10% FBS) è stato cambiato ogni quattro giorni.

L'HBR è stato utilizzato alla concentrazione di 1.5 mg/ml per ottenere il massimo differenziamento cardiaco, secondo il protocollo di precedenti lavori (Ventura C., 2007).

#### **4.1b ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA**

L'RNA totale è stato estratto a 8 ore, 24 ore, 3 giorni e 10 giorni dalle cellule in coltura in presenza (trattati) o assenza (controlli) di HBR, con il Trizol seguendo il protocollo della ditta fornitrice (Invitrogen), ed risospeso in RNAase-free water e quantificato mediante lettura spettrofotometrica al Nanodrop (Fisher Scientific SAS, Illkirch Cedex, France).

L'RNA totale ottenuto è stato retrotrascritto in cDNA per valutare l'espressione genica con la Real-Time PCR dei geni delle Smad1, Smad3, Smad4 e Smad 7. L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA in un volume finale di reazione di 50 µl, per 1 ora a 37°C, aggiungendo alla miscela di reazione 1 mg di RNA 200U M-MLV Reverse Transcriptase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), 0.5 mM dNTPs (desossinucleotidi trifosfato) e 20U RNasin Ribonuclease Inibitor (inibitore di RNasi purificato da placenta umana), in M-MLV RT Buffer (Invitrogen). L'enzima di retrotrascrizione è stato successivamente inattivato a 95°C per 2 minuti.

La Real-Time è una metodica che permette la quantificazione di una sequenza bersaglio all'interno di una miscela eterogenea di molecole di o cDNA, in base al fatto che esiste una relazione tra la quantità di template di partenza e il prodotto di PCR corrispondente. Per la real-time PCR è stato utilizzato iCycler Thermal Cycler della Bio-

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Rad, 5ng di cDNA in 25 µl di reazione con la Platinum Supermix UDG (Invitrogen), 200 nM di ogni primer, 10 nM fluorescein (BioRad), e Sybr Green. Dopo uno step iniziale di denaturazione a 94°C per 10 min, inizia l'amplificazione ogni ciclo 94°C for 15 s, 55–59°C for 30 s e 60°C for 30 s.

La curva di reazione si presenta come un diagramma sigmoide di amplificazione, in cui l'intensità di fluorescenza è espressa in funzione del numero di cicli di amplificazione. Il ciclo in cui si verifica un aumento di fluorescenza che interseca la soglia, è calcolata sulla base dell'intensità media di fluorescenza dei primi cicli (rumore di fondo), è detto ciclo soglia (Ct, Cycle threshold). L'analisi dei dati e la definizione del valore Ct è stata effettuata utilizzando il "Metodo della Derivata Seconda", algoritmo fornito dal software in dotazione allo strumento.

I primer utilizzati sono dell' Invitrogen e sono stati descritti prima da altri autori (Shen H.2003)( Wang H, 2003). Per verificare che i prodotti di amplificazione ottenuti non siano degli aspecifici e che non si siano formati da dimeri di primer, che potrebbero compromettere la quantificazione del prodotto amplificato, al termine dell'amplificazione si esegue un'analisi della curva di dissociazione (Melting Curve), che permette di individuare la temperatura di fusione (Tm) specifica per ogni amplificato esaminato. L'espressione relativa di ogni gene è stata determinata con il metodo del delta-CT, la quantità del trascritto del gene d'interesse è stata normalizzata rispetto alla quantità del trascritto di un gene housekeeping, GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi)

Ciascun campione è stato analizzato in duplicato e in ogni reazione sono stati inclusi almeno 2 controlli negativi in cui non è stato aggiunto alcun cDNA.

#### **4.1b NUCLEAR RUN-OFF TRANSCRIPTION ASSAY**

Isolamento dei nuclei e la valutazione della purezza nucleare è stato eseguito secondo il protocollo (Ventura 2007). RNA nucleare è stato isolato utilizzando il metodo descritto da Chomczynsky P., con guanidina tiocianato e estrazione acido fenolo(Chomczynsky P., 1982) e purificato su RNAMATRIX. Uguali quantità (cpm) di 32P-RNA marcato nucleare sono state sottoposte a Rnase protection assay

Mediante ibridazione in soluzione per 12 ore a 55°C in presenza di una sonda fredda la Smad4 mRNA antisense non marcata. Per generare la sonda sono stati utilizzati frammenti di

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

cRNA, cDNA dei geni Smad4 di ratto (268 bp), o GAPDH (597 bp) inseriti in un vettore pCRII-TOPO.

Alla fine del periodo dell'ibridazione i campioni son stati trattati con una combinazione di Rnasi A e T1, esposti alla proteinasi K, estratti con RNAMATRIX (BIO101, Inc., Vista, CA,USA) e separati mediante elettroforesi su gel non denaturante di poliacrilamide al 4% e successiva esposizione radiografica per 48h a -80°C.

#### **4.1d IMMUNOFLUORESCENZA**

Le GTR1, dopo selezione delle cellule differenziate in cardiomiociti con la puromicina, e leFMhMSCs sono state sottoposte al protocollo di immunofluorescenza per valutare la presenza delle proteine specifiche del differenziamento cardiaco. Le cellule sono state trasferite su vetrino con una bassa densità per permettere la visualizzazione delle singole unità, e fissate con paraformaldeide al 4%, esposte per 1 ora a 37°C all'anticorpo monoclonale mouse contro  $\alpha$ -sarcomeric actinin o Smad1, e all'anticorpo policlonale rabbit contro Smad3,Smad4, e Smad7. Per evidenziare il legame dell'anticorpo primario alla propria proteina bersaglio è stato utilizzato goat IgG coniugato con la fluoresceina per 1 ora a 37°C. Per una doppia reazione di immunofluorescenza è stato utilizzato lo stesso protocollo dei casi precedenti ma con simultanea incubazione di 2 anticorpi sullo stesso campione, l'anticorpo monoclonale mouse anti  $\alpha$ -sarcomeric actinin e l'anticorpo policlonale rabbit anti Smad4 diluiti 1:100, evidenziati con gli anticorpi secondari goat IgG coniugato con la fluoresceina e mouse anti-rabbit IgG coniugato con la rhodamine. Il DNA è stato marcato con Propidium Iodide (1 ug/ml) o DAPI (1 mg/ml) per evidenziare i nuclei. La presenza e la localizzazione della fluorescenza è stata analizzata al microscopio confocale Leica (Leica TCSSP5).

#### **4.1e IMMUNOBLOTTING**

Le cellule GTR1 e FMhMSCs trattate e non con l'HBR sono state raccolte in PBS e centrifugate a 2000g per 10 m, il pellet è stato risospeso in tampone di estrazione cellulare (Invitrogen) per lisare le cellule ed estrarre le proteine. Le proteine son state divise per

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

elettroforesi secondo il peso molecolare in 10% Novex Tris-glicina gel di poliacrilammide (Invitrogen, CA), con il tampone di corsa MOPS SDS, utilizzando un SureLock Xcell™ Mini-Cell. Dopo il trasferimento dal gel alla membrana di nitrocellulosa (PVDF)(Invitrogen, CA), le proteine sono state esposte alla reazione immunologica primaria per 3 ore a 4°C in presenza di anticorpi primari contro Smad1, Smad3, Smad4 e Smad7(Abcam) diluiti 1:1000, e dopo vari lavaggi, alla secondaria in presenza degli anticorpi secondari (Abcam). La presenza delle proteine Smad è stata valutata con il sistema di rilevazione della chemiluminescenza (ECL Western blotting).

#### **4.1f ANALISI DELL'IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA (CHIP)**

Durante il trattamento con HBR, le cellule GTR1 e FMhMSC, sono state pellettate a 24, 48, e 72 ore dall'inizio dell'esperimento (Time 0). L'analisi della immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) è stata effettuata con il ChIP Assay Kit Upstate Biotechnology's (Upstate Gruppo), in vivo ed evidenzia le interazioni tra DNA e proteine, quindi l'associazione di proteine regolatrici a specifiche regioni genomiche come: fattori di trascrizione su promotori, al fine di evidenziare unità codificanti. Le cellule sono state lavate con PBS, trattate con un agente che provoca la formazione di legami covalenti-crociati fra il DNA e le eventuali proteine ad esso legate, come la formaldeide 1% (Sigma, St. Louis, MO) per 20 min a temperatura ambiente, la reazione di crosslinking è bloccata con la glicina 0,125 molare. Le cellule sono state poi raccolte e lisate in ghiaccio per 10 minuti e la cromatina estratta è stata frammentata tramite sonicazione, con ampiezza del 10%, in undici cicli di 30 s, distanziati da 15 s, utilizzando un modello di Fisher 550 di Sonic Dismembrator (Fisher, Pittsburgh, PA). Il prodotto così ottenuto è stato esposto all'anticorpo (2 µg) IgG goat anti-Smad4 (Santa Cruz) overnight, con immunoprecipitazione del complesso. I frammenti di DNA recuperabili dall'immunoprecipitato seguendo l'eluizione sono stati estratti con fenolo-cloroformio e risospesi in DPCW, e successivamente analizzati mediante Real-Time PCR.

La Real-time PCR è stata eseguita utilizzando il Applied Biosystem 7300System e con Universal FastStart SYBR Green Master (ROX) della Roche. I dati ottenuti sono stati analizzati con il metodo del delta-CT [45]. Ciascun gruppo di dati è stato ottenuto da tre esperimenti indipendenti. Il DNA in ingresso (1% del totale della cromatina utilizzata per la reazione di immunoprecipitazione) è stato usato come riferimento e il segnale di background

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

(il normale immunoprecipitato IgG -DNA) come calibratore. Le sequenze dei primer usati sono:

Nkx2.5forward ACAGAAACCCCATCTGTTTCC;

Nkx2.5 reverse CTGCAATCAGCCGCGAAAAGTA

2 [(Ct background – Ct Input background) – Ct Ab – CT Input Ab)]

Dove Ct è il valore soglia (threshold cycle), background è il normale immunoprecipitato rabbit IgG-campione e Ab è l'immunoprecipitato Smad4-campione.

#### **4.1g ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica dei dati ottenuti, è stata fatta utilizzando un'analisi unidirezionale della varianza seguita dal Tukey's multiple comparison test, assumendo a  $p < 0.005$  come limite per la significatività.

#### **4.2 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI IN MODO ASSIMMETRICO A BASSA ENERGIA E CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE**

Gli effetti dei campi elettromagnetici ed in particolare dei campi a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF ) sui sistemi biologici sembrano dipendere dalle caratteristiche fisiche del segnale, dai parametri di esposizione e dal tipo cellulare, e influenzano diversi processi biologici tra cui il differenziamento.

Cellule staminali embrionali murine R1, sono state sottoposte a campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico a bassa frequenza per valutare se tali stimoli fisici possono influenzare il comportamento delle cellule in vitro, modulando eventi molecolari impiegati nel differenziamento.

#### **4.2a PROTOCOLLO DI DIFFERENZIAMENTO DELLE STAMINALI EMBRIONALI MURINE R1**

Per esporre le cellule ES R1, dopo la rimozione del LIF ( per le condizioni di coltura vedi la sezione riguardante le GTR1) ai campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico a bassa energia è stato utilizzato il REAC (Radio Electric Asymmetric Conveyer) un

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

dispositivo medico innovativo, un biostimolatore sistemato nell'incubatore per colture cellulari.

Il REAC emette campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico di 2.4 GHz direttamente localizzate nella coltura cellulare attraverso gli elettrodi collegati alle sonde laminari immerse nel terreno di crescita.

La potenza irradiata è di circa 2 mW, il campo elettro è di  $E = 0,4 \text{ V/m}$ , il campo magnetico prodotto è di  $1 \text{ mA/m}$ , la corrente radioelettrica che scorre nel mezzo di coltura durante ogni singolo impulso è di  $J=30 \mu\text{A/cm}^2$  e la piastra con le cellule è posizionata a 35 centimetri dalla sorgente di emissione. La durata del singolo impulso è di 200 ms con un intervallo di 2,5 secondi tra un impulso e il successivo.

Le R1 sono state sottoposte all'influenza dei campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico per 72 ore e poi lasciate in coltura per altri 7 giorni per un totale di 10 giorni. Altre cellule R1 (controlli) hanno seguito lo stesso protocollo di differenziamento senza il trattamento con il REAC.

#### **4.2b ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA**

Su tali condizioni sperimentali, è stato valutato l'effetto della stimolazione con il REAC, sull'espressione di fattori di trascrizione legati al fenotipo cardiaco (Prodynorphin, GATA4 e Nkx-2.5), al fenotipo neuronale (Neurogenin1), a quello muscolo scheletrico (myoD) e alla staminalità (Oct4, Sox2, Nanog).

L' RNA totale è stato estratto a 24-48ore, a 7 giorni dall'inizio dell'esperimento (time 0), dalle cellule in coltura in presenza (trattati) o in assenza (controlli) della radiofrequenza. Per l'estrazione è stato utilizzato il Trizol seguendo il protocollo della ditta fornitrice (Invitrogen), ed l' RNA è stato risospeso in RNAase-free water e quantificato mediante lettura spettrofotometrica al Nanodrop (Fisher Scientific SAS, Illkirch Cedex, France).

L'RNA totale ottenuto è stato retrotrascritto in cDNA (per il protocollo vedi la sezione riguardante l'espressione delle GTR1 trattate con HBR) per valutare l'espressione genica con la Real-Time PCR dei geni d'interesse. I primer utilizzati sono dell' Invitrogen e sono stati descritti prima da altri autori (Chew J. L.,2005) (Dobbin E., 2009)( Kashyap V. 2009)( Rawls A. 1995). I dati ottenuti son stati normalizzati rispetto al gene housekeeping, GAPDH

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

(gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi) e l'espressione relativa è stata determinata con il metodo del Delta-CT.

#### **4.2c IMMUNOFLUORESCENZA**

Le cellule R1 trattate con il REAC per 3 giorni e poi lasciate in coltura per altri 4 giorni per un totale di 7 giorni dall'inizio dell'esperimento, e i controlli sottoposti allo stesso protocollo ma senza il trattamento REAC sono state trattate con il protocollo dell'immunofluorescenza (vedi sezione riguardante l'immunofluorescenza delle GTR1 trattate con HBR), con anticorpi monoclonali mouse anti  $\alpha$ -sarcomeric actinin, anti  $\beta$ -3-tubulin, anti MyoD e anti Myogenin, e anticorpi policlonali rabbit contro Myosin heavy chain, i nuclei evidenziati con Propidium Iodide (1  $\mu$ g/ml) che si lega al DNA. La fluorescenza è stata visualizzata al microscopio confocale Leica (LEICA TCSSP5).

#### **4.2d IMMUNOBLOTTING**

Le cellule R1 trattate e non con il REAC sono state raccolte in PBS e centrifugate a 2000g per 10 m, il pellet è stato risospeso nel tampone di estrazione cellulare (Invitrogen) per lisare le cellule ed estrarre le proteine. Le proteine sono state divise per elettroforesi secondo il peso molecolare in 10% Novex Tris-glicina gel di poliacrilammide (Invitrogen, CA), con il tampone di corsa MOPS SDS, utilizzando il SureLock Xcell™ Mini-Cell. Dopo il trasferimento dal gel alla membrana di nitrocellulosa (PVDF)(Invitrogen, CA), le proteine sono state esposte alla reazione immunologica primaria per 3 ore a 4°C in presenza di anticorpi primari contro GATA binding protein 4 (GATA4), myogenic differentiation 1 (MyoD),  $\beta$ 3-tubulin, sex determining region Y-box 2 (Sox2) e Nanog (Abcam) diluiti 1:1000, e dopo vari lavaggi, alla secondaria per 2 ore a 4°C in presenza degli anticorpi secondari anti-rabbit (Sox2 and Nanog) o anti-mouse (GATA4, MyoD,  $\beta$ -3-tubulin) coniugati (HRP) (Abcam). La presenza delle proteine target è stata valutata con il sistema di rilevazione della chemiluminescenza (ECL Western blotting).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

#### **4.2e LE COLONIE BATTENTI**

L'analisi della resa delle colonie battenti o corpi contrattili spontanei è stata ottenuta dalle cellule embrionali R1 fatte crescere in sospensione, in piastre particolari (Costar ultra-lowattachment clusters), con formazione dopo 48 ore dalla rimozione del LIF dei corpi embrioidi Ebs, che rappresenta un passaggio fondamentale per il differenziamento cardiaco.

Dopo 3 giorni di trattamento con i campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico a bassa energia, le cellule sono state passate in piastre tissue culture, per la crescita in adesione, e al decimo-dodicesimo giorno si evidenziano al microscopio ottico i corpi contrattili spontanei.

#### **4.2f ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica utilizzata per valutare se i dati ottenuti sono significativi è il Student's t-test, assumendo  $p < 0.05$  come limite per la significatività.

### **4.3 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI IN MODO ASSIMMETRICO E FIBROBLASTI CUTANEI UMANI.**

In questo studio, è stato analizzato il profilo di espressione genica e proteica di cellule somatiche adulte, i fibroblasti cutanei umani (HSFS), sottoposti a campi radioelettrici convogliati a bassa energia, per valutare se questo stimolo fisico riesce a riprogrammare direttamente cellule già specializzate, verso destini differenziativi alternativi senza passare dallo stadio di cellula staminale.

#### **4.3a PROTOCOLLO DI RIPROGRAMMAZIONE DEI FIBROBLASTI**

I fibroblasti cutanei umani sono stati coltivati in terreno completo contenente Alpha MEM, 10% di siero bovino fetale (FBS) (Gibco/Invitrogen), 2% di L-glutamina e 2% di penicillina/ streptomicina. Per gli esperimenti, le cellule sono state seminate ad una concentrazione di  $5 \times 10^3$  cellule/pozzetto in una piastra multipozzetto tissue culture per la

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico



crescita in adesione, e coltivate in presenza del campo radioelettrico convogliato (RECF) prodotto dal REAC per 72 ore. Dopo il trattamento con i RECF le cellule sono state mantenute in coltura per ulteriori 4 o 7 giorni senza lo stimolo. Il terreno di coltura durante i dieci giorni in coltura non è stato mai sostituito.

#### **4.3b VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ, DEL TASSO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE E DELL'APOPTOSI**

La vitalità cellulare è stata determinata mediante il test standard di esclusione del trypan blue, un colorante carico negativamente che non è in grado di attraversare la membrana delle cellule intatte, ma attraversa quella delle cellule necrotiche accumulandosi nel citoplasma e colorandole di blu. Le cellule trattate e non con il REAC, sono state staccate con la tripsina dalla superficie di adesione, e 10 $\mu$ l di sospensione cellulare sono stati miscelati con 10 $\mu$ l di Trypan blue allo 0,1%, la conta e la vitalità sono state fatte con il countess automated cell counter su vetrini adatti.

L'apoptosi è stata determinata mediante l'attività della caspasi 3, utilizzando il kit commerciale Fluorimetric Caspasi 3 Assay Kit della Sigma (Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) secondo il protocollo del produttore. Il pellet cellulare è stato disciolto in 35  $\mu$ l di tampone di lisi, il lisato cellulare ottenuto è stato aggiunto al substrato peptidico della Caspasi 3 l'acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC).

Il rilascio del prodotto fluorescente 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) dall'azione della caspasi 3 sul suo substrato, è valutato come misura dell'idrolisi del substrato da parte della caspasi 3, maggiore è la fluorescenza, maggiore sarà la concentrazione dell'enzima.

La morte cellulare è stata verificata mediante la determinazione dell'enzima citoplasmatico lattato deidrogenasi (LDH) attraverso l'impiego del LDH cytotoxicity assay kit II (MBL international corporation). Questo enzima si trova in forma stabile all'interno di tutte le cellule, ma viene rapidamente rilasciato nell'ambiente extracellulare in seguito ad un danno alla membrana plasmatica. Per quantificare tale enzima si effettua un saggio colorimetrico che sfrutta l'accoppiamento di due reazioni: riduzione del NAD<sup>+</sup> a NADH/H<sup>+</sup> in concomitanza alla conversione del lattato a piruvato catalizzata dalla LDH, e trasferimento, mediato dal catalizzatore, del H/H<sup>+</sup> dal NADH/H<sup>+</sup> al sale di tetrazolo (giallo) che viene in questo modo ridotto a formazano (rosso). Un aumento del grado di morte cellulare o del numero di cellule

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

con danni alla membrana plasmatica causa un aumento della quantità di LDH rilasciata; l'incremento dell'ammontare di enzima è correlato alla quantità di formazano formatosi in un certo periodo di tempo. Perciò l'entità dello sviluppo del colore, quantificata tramite assorbanza, è proporzionale al numero di cellule danneggiate.

#### **4.3c PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA**

La RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) è un procedimento efficace per determinare in tempo reale l'espressione genica. L'espressione si comincia a vedere quando viene raggiunto il valore soglia (ciclo di soglia) di fluorescenza del reporter, cioè quando i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema. Prima viene raggiunto il ciclo di soglia, maggiore è l'espressione genica.

L'RNA totale è stato estratto a 24-48-72 ore, a 7 e 10 giorni dall'inizio dell'esperimento (time 0), dalle cellule in coltura in presenza (trattati) o in assenza (controlli) della radiofrequenza. Per l'estrazione è stato utilizzato il Trizol seguendo il protocollo della ditta fornitrice (Invitrogen), ed l'RNA è stato risospeso in RNAase-free water e quantificato mediante lettura spettrofotometrica al Nanodrop (Fisher Scientific SAS, Illkirch Cedex, France).

L'RNA totale ottenuto è stato retrotrascritto in cDNA (per il protocollo vedi la sezione riguardante l'espressione delle GTR1 trattate con HBR) per valutare l'espressione genica con la Real-Time PCR dei geni d'interesse.

La Relt-time è stata fatta con i primer dell' Invitrogen precedentemente descritti (Cartwright P.,2005)( Chew J.2005)( Lints TJ.,1993)( Maioli M.,2007)(Maioli M.,2010), per approfondire il mantenimento della staminalità (Oct4-Sox2-Nanog-cMyc-Klf4), il differenziamento cardiaco (GATA4-Tbx5-Mef2c-Nk2.5) e il differenziamento muscolo scheletrico (MyoD).

I dati ottenuti son stati normalizzati rispetto al gene housekeeping, GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi) e l'espressione relativa è stata determinata con il metodo del Delta-CT.

#### **4.3d CITOFLUORIMETRIA**

I fibroblasti (HSFS) dopo trattamento con RECF per 72 ore, sono stati raccolti mediante trattamento con tripsina 0,08% EDTA, fissati, permeabilizzati, e a 1 µg/10<sup>6</sup> cellule è stato

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

aggiunto l' anticorpo primario diretto contro  $\beta$ 3-tubulina, MyoD e  $\alpha$ -sarcomeric actinin per 1 ora a 4 ° C. Dopo l'incubazione con il primario, è stato aggiunto 1  $\mu$ g di anticorpo secondario coniugato con fluoresceina isotiocianato per 1 ora a 4 ° C al buio. Dopo un lavaggio, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (FACS Aria, BD Biosciences, San Jose, CA) raccogliendo 10.000 eventi, ed i dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il FACS Diva software (BD Biosciences).

#### **4.3e IMMUNOFLUORESCENZA**

I fibroblasti sono stati coltivati per 3 giorni con o senza esposizione al REAC e poi lasciati in coltura per altri 4 giorni senza il trattamento REAC. Per meglio valutare l'effetto a livello molecolare del campo radioelettrico convogliato, le cellule sono state preincubate per 2 ore prima del trattamento con il REAC, con il free radical scavenger N-(2-mercapto-propionyl)-glycine (NMPG) (100  $\mu$ M). Dopo 7 giorni, le cellule sono state trattate con tripsina, e la sospensione risultante è stata seminata su vetrino, a bassa densità per consentire la visualizzazione delle singole cellule. Dopo 24 ore le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4%, ed esposte: per 1 ora a 37 ° C a anticorpi monoclonali anti- $\alpha$  sarcomeric actinin, anti- $\beta$ -3-tubulina, anti-MyoD e Miogenina, e dopo dei lavaggi all'anticorpo policlonale IgG goat coniugato con la fluoresceina, a 37 ° C per 1 ora. Il DNA è stato marcato con 1  $\mu$ g/ml di 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

La fluorescenza è stata valutata al microscopio confocale Leica (LEICA TCSSP5).

#### **4.2f ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata fatta con Statistical Package for Social Science (SPSS), versione 13. Per questo studio è stato utilizzato il test statistico non parametrico Kruskal-Wallis e il Wilcoxon Signed Rank test, il primo per valutare le distribuzioni e l'omogeneità della varianza di ciascun gruppo in momenti diversi di osservazione, il secondo è stato utilizzato per valutare, nello stesso gruppo, le differenze (Delta CT) tra i dati raccolti in un periodo di osservazione e il valore basale di riferimento.

I Test e tutti i risultati,  $P < 0,05$ , sono stati considerati statisticamente significativi.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

## **5.0 RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **5.1 GLI ESTERI DI ACIDO IALURONICO GUIDANO L'ESPRESSIONE GENICA DELLE SMAD E MIGLIORANO L'ORIENTAMENTO VERSO IL FENOTIPO CARDIACO IN CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE E IN CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE**

#### **5.1a L'HBR MODULA L'ESPRESSIONE GENICA DI SMAD1,3,4, E 7 IN CELLULE GTR1 ES E FMHMSCS**

Le cellule GTR1 (Ventura C.,2003) sono state usate come un modello in vitro della cardiogenesi, per chiarire se l'attivazione della cascata di segnalazione delle Smad può essere uno dei meccanismi alla base del differenziamento cardiaco indotto dal HBR.

Quando coltivate in assenza di LIF e in sospensione, queste cellule aggregano in corpi embrioidi EBS, evolvendo in modo spontaneo come cardiomiociti contrattili dopo 7-8 giorni di coltura. Dopo la selezione con Puromicina, si ottiene una popolazione quasi pura di cardiomiociti derivati dalle ES.

L'espressione genica di Smad1, 3,4, e 7 è stata studiata mediante real-time RT-PCR in diversi momenti della cultura di ES GTR1 in assenza o presenza di HBR. Per indagare ulteriormente se l'HBR può avere un ruolo nel patterning delle Smad, l'estere misto di acido ialuronico è stato applicato anche alle FMhMSCs, una popolazione di cellule mesenchimali umane (HMSC) che con il trattamento con l'HBR potrebbe essere impegnata nel differenziamento cardiovascolare in vitro, offrendo la possibilità di riparare il miocardio in vivo, risultato già ottenuto dopo trapianto in cuori di ratto infartuati (Ventura 2004). In entrambi i tipi di cellulari l'azione dell'HBR dopo 8 ore di coltura dal ritiro del LIF (tempo zero), si evidenzia con l'aumento dell'espressione genica di ciascuna isoforma, Smad1, 3 e 4 (Figura 1A-1C), infatti l'espressione è notevolmente superiore rispetto alle cellule non trattate. Nel caso di Smad7 l'espressione nei controlli non trattati è diminuita rispetto al tempo zero, e l'HBR aumenta notevolmente l'inibizione della trascrizione di questo gene (Figura 1D).

Dopo 24 ore, l'espressione genica di Smad1-4 è aumentata rispetto al tempo zero, i trattati-HBR mantengono livelli di espressione sempre più elevati rispetto alle cellule di controllo non trattate (Figura 1A-1C).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

L'espressione genica spontanea di queste SMADs diminuisce dopo 72 ore di coltura, in Smad4 e Smad 1 in misura minore rispetto a Smad 3, però i trattati-HBR esibiscono ancora maggiori livelli di mRNA rispetto alle cellule non esposte in Smad 3 e 4 (Figura 1B,1C) mentre in Smad1 è similmente espresso in entrambi i gruppi di cellule (Figura 1A).

L'analisi comparativa dell'mRNA delle Smad1, 3, 4 è stata eseguita anche a 10 giorni dal momento della rimozione del LIF, sulle GTR1 in assenza o presenza di HBR dopo 4 giorni di selezione da parte della puromicina. In queste condizioni sperimentali, l'HBR ha invertito il suo effetto, downregolando l'espressione dei geni analizzati, rispetto ai non esposti (controlli) (Figura 1A-1C).

L'espressione genica di Smad7, prima negativa, aumenta progressivamente in Ebs dopo 24 ore di coltura, avvicinandosi al livello zero dopo 10 giorni nei cardiomiociti derivati dalle ES GTR1, ma rimanendo downregolato nelle cellule trattati-HBR, rispetto al corrispondente controllo non trattato (Figura 1D).

Per valutare ulteriormente se la risposta delle cellule all'azione dell'HBR, osservata nelle GTR1 può rappresentare una caratteristica generale dell'azione di questa molecola sulle cellule staminali, è stato analizzato l'effetto dell' HBR sull'espressione genica delle SMADs nelle cellule FMhMSCs. E' stato precedentemente dimostrato (VenturaC. 2004) che dopo esposizione all'HBR le FMhMSCs esprimono un consistente aumento della trascrizione dei geni cardiaci GATA-4 e Nkx-2.5, con alto rendimento differenziativo evidenziato dall'espressione dei marcatore cardiaci. Come mostrato in figura 2, nelle FMhMSCs l'mRNA di Smad1, 3, e 4 è espresso spontaneamente. È interessante notare, che l'espressione genica di queste SMADs è significativamente migliorata a seguito di un esposizione di 48 ore all'estere misto, rimanendo upregolata durante un successivo periodo di 3 giorni, rispetto ai controlli non trattati (Figura 2A-2C). Confermando i risultati ottenuti dalle GTR1, le FMhMSCs esposte all'HBR mostrato una minore quantità di mRNA di Smad7, rispetto ai controlli non trattati (Figura 2D).

## **5.1b EFFETTI DELL'HBR SULL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE SMAD DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO CARDIACO IN CELLULE ES GTR1 E FMHMSCS**

I livelli cellulari delle proteine Smad sono il risultato di un delicato equilibrio tra i tassi della trascrizione del corrispondente gene e i meccanismi di regolazione post-trascrizionale. Pertanto, è stato importante esaminare l'espressione delle proteine Smad nei corpi embrioidi (EBS) e nei cardiomiociti derivati dalle ES GTR1 in presenza o assenza di HBR.

Come mostrato mediante Western blot e analisi densitometrica, l'espressione spontanea delle proteine di Smad1 e 3, a poco a poco aumenta dopo 8 ore dal rimozione del LIF (tempo zero), fino a 10 giorni (Figura 3A, 3B) mentre quella di Smad4 è aumentata già a 8 ore, con cambiamenti meno apprezzabili nei tempi successivi (Figura 3C). Il trattamento con l'HBR ha un'azione sull'espressione di queste proteine, diversa nel tempo rispetto alle cellule non trattate, alzando i livelli di Smad1 già a 24 ore (Figura 3A), mentre l'aumento dei livelli di SMAD3 e 4 da 24 fino a 72 ore è graduale (Figura 3B, 3C).

Al contrario, l'espressione di Smad7, che è costantemente rilevabile nelle GTR1 allo stato indifferenziato in presenza del LIF (non mostrato), progressivamente diminuisce durante il differenziamento cardiaco. L'HBR downregola ulteriormente l'espressione di questa proteina Smad fino a 72 ore, ma l'effetto è più marcato ai 10 giorni, rispetto alle cellule non esposte (Figura 3D).

In linea con i dati ottenuti con le cellule staminali GTR1, l'HBR migliora significativamente l'espressione proteica di Smad1, 3, e 4 nelle FMhMSCs, rispetto alle cellule non trattate (Figura 4A-4C). L'effetto dell'HBR sull'espressione della Smad4 è già evidente dopo 48 ore, mentre una upregolazione massima di Smad1, e 3 è raggiunta dopo 72 ore di trattamento. Come in GTR1 l'HBR ha accentuato il declino dell'espressione della Smad 7 durante il differenziamento cardiaco fino alle 72 ore, ma ai 10 giorni ha significativamente contrastato la downregolazione di questa proteina (Figura 4D).

È stato poi valutato se i risultati ottenuti con il Western blot sono confermati dall'analisi dei marcatori proteici a livello di cellula intatta. Per questo, è stata fatta l'analisi d'immunofluorescenza sulle GTR1 trattate e non con l'estere misto. Come mostrato in figura 5, HBR suscita un notevole aumento della fluorescenza per Smad1, 3, e 4 (pannello B), rispetto alle cellule ES GTR1 non trattate (Pannello A). Queste osservazioni confermano ulteriormente che la stimolazione prodotta dall'HBR a partire dall'espressione genica di

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Smad1, 3, e 4 comprendeva anche un aumento della proteina codificata. Inoltre l'analisi di immunofluorescenza ha anche confermato che HBR non è riuscito a indurre l'espressione delle proteine Smad7, come si evince dalla maggiore intensità di fluorescenza rilevata nei controlli non trattati rispetto alle cellule esposte all'HBR (Figura 5).

È interessante notare che, in sperimentazioni separate, è stato dimostrato che GTR1 trattati per 24 ore con HBR in concomitanza con la Smad4 esprimono anche una coerente quantità di  $\alpha$ -sarcomeric actinin, un marker che evidenzia l'orientamento delle cellule staminali verso il fenotipo cardiaco (Figura 6B).

Nel caso delle GTR1 di controllo non trattate con HBR, l'espressione di Smad4 è solo associata ad una tenue fluorescenza della  $\alpha$ -sarcomeric actinin (Figura 6A). Un risultato simile è stato ottenuto con le FMhMSCs in presenza di HBR per 7 giorni, la resa di cellule positive sia a Smad4 che a  $\alpha$ -sarcomeric actinin è notevolmente migliorata (Figura 6D) rispetto alle cellule non esposte (figura 6C).

### **5.1c L'HBR AUMENTA LA TRASCRIZIONE DELLA SMAD4 IN NUCLEI ISOLATI**

Per analizzare ulteriormente la risposta cellulare all'HBR, e approfondire in particolare l'effetto sul tasso di trascrizione genica della Smad4 e se il meccanismo d'azione è attuata dall'unità o dopo idrolisi del complesso e rilascio dei singoli componenti, è stata determinata la velocità di trascrizione mediante nuclear run-off Transcription Assay. La Figura 7 mostra che in nuclei isolati da cellule staminali GTR1 o FMhMSCs trattate con l'HBR, c'è un consistente aumento del tasso di trascrizione della Smad4, rispetto ai nuclei isolati dalle cellule non trattate. In esperimenti separati, i nuclei sono stati isolati da cellule non trattate e successivamente incubate con HBR, o esposti ai singoli componenti HA, BU, o RA somministrati da soli o in combinazione. Mentre l'incubazione nucleare con HBR o HA è stato inefficace, mentre il trattamento con BU o RA aumenta maggiormente la trascrizione genica di Smad4 (Figura 7). Il tasso di trascrizione è ulteriormente aumentato quando i nuclei sono stati esposti alla combinazione di BU e RA (Figura 7).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

### **5.1d L' ESPRESSIONE GENICA DI NKX2.5 È MEDIATA DA SMAD4 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO CARDIACO INDOTTO DALL'HBR**

Per esaminare se Smad4 è stato un fattore di trascrizione cruciale nel programma molecolare del differenziamento cardiaco mediato dell'HBR è stata eseguita l'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) su cellule ES in assenza o presenza di HBR. I trattati con HBR hanno mostrato un complesso Smad4- promotore del gene Nkx 2,5 vincolante (Figura 8A). L'immunoprecipitazione con un anticorpo antiSmad4 ha rivelato che gli estratti nucleari di controllo e i trattati hanno generato un prodotto di amplificazione per il sito di legame SBE sul promotore di Nkx-2.5.

Inoltre, la quantità di DNA amplificato è significativamente superiore nel trattato GTR1 rispetto ai controlli (Figura 8A). L'imput di controllo ha rivelato che simili quantità di DNA sono presenti sia in cellule non trattate che in cellule trattate con HBR. Per stabilire se questo meccanismo può avere un ruolo causale nei processi di differenziamento cardiaco indotti dall'HBR, è stato effettuato un'analisi comparativa degli effetti dell' HBR sul rendimento dei cardiomiociti, derivati da cellule ES GTR1 normali e da cellule GTR1 sottoposte a silenziamento della Smad4 con lentiviral-mediated Smad4 shRNA, un approccio che ha portato al silenziamento coerente dell'espressione del mRNA e della della proteina Smad4 (Figura 8B, 8C).

Entrambi i gruppi di cellule sono state coltivate in assenza o presenza di HBR dal momento dell'eliminazione del LIF, e selezionate con la puomicina per 4 giorni. Le colture di cellule GTR1 esposte al HBR c'è un consistente aumento del numero di colonie contrattili spontanee, rispetto ai controlli non trattati (figura 8D). Sottolineando l'importante ruolo di Smad4 nel differenziamento cardiaco, il silenziamento di Smad4 ha quasi annullato il differenziamento cardiaco delle cellule ES, portando ad una diminuzione notevole nel numero di cellule resistenti alla puomicina, delle colonie battenti spontanee, rappresentando solo l'1-2% rispetto alla popolazione cellulare ottenuta dalle GTR1 normali (figura 8D). È interessante notare, che l'effetto dell'HBR decade e non influenza la quantità corpi contrattili spontanei prodotti nelle cellule Smad4-silenziate (Figura 8D).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



## 5.1e DISCUSSIONE

Ci sono prove convincenti che il percorso necessario sia per lo sviluppo del cuore in vivo che per il differenziamento delle cellule staminali pluripotenti in cardiomiociti in vitro, è mediato dal pathway delle Smad. Abbiamo cercato in questo esperimento la prova che l'HBR è in grado di regolare finemente il processo molecolare relativo al gruppo di trasduttori di segnale delle Smad.

Il risultato ottenuto evidenzia che l'HBR sovraesprime Smad1 e 4 influenzando l'espressione genica, e la produzione della proteina attiva in cellule staminali GTR1, come pure nelle FMhMSCs è particolarmente gratificante. Poter aumentare l'espressione di Smad1 e 4, con l'HBR senza la trasfezione dei geni corrispondenti, e senza stimolare la trascrizione di BMP, in cellule staminali embrionali GTR1 e adulte FMhMSCs, accoppiando l'attivazione della cascata dei trasduttori del segnale Smad con l'esecuzione del programma specifico del differenziamento cardiaco.

Il meccanismo d'azione dell'HBR sulla trascrizione del gene di SMAD3 e sulla produzione della proteina corrispondente è ancora da chiarire. Tuttavia è stato dimostrato che Smad3 ha un ruolo fondamentale nel proseguimento della cascata di segnalazione dopo la fosforilazione di R-Smad, essendo coinvolta nell'assemblaggio di Smad4 in un complesso eterotrimerico con una stechiometria di due subunità Smad3 e una subunità Smad4 (Moustakas A.,2001).HBR-mediata L'aumento dell'espressione proteica di Smad1 mediato dall'HBR ha una breve durata rispetto all'effetto dell'estere misto sull'espressione di Smad3 e 4. Recentemente, è diventato evidente che i livelli cellulari delle Smad sono sottoposti a una complessa regolazione differenziale, con l'ausilio del processo ubiquitina-proteasoma (Liu T., 2010) Non si può escludere che, differenze temporali nella risposta delle singole SMADs all'azione dell'HBR, possono riflettere i cambiamenti, le modificazioni post-trascrizionali di queste proteine, meccanismi ancora in gran parte inesplorati. Lavori supplementari sono necessari per chiarire le possibili implicazioni dell'effetto dell'HBR sui processi di regolazione delle interazioni dei membri Smad.

L'inibizione dell'espressione genica e proteica di Smad7, che ha funzioni inibitorie, può rappresentare una parte rilevante dell'effetto sul differenziamento in cardiomiociti delle cellule staminali da parte dell'estere misto. Infatti, l'espressione del gene di Smad7 è potentemente aumentato dal LIF, una citochina in grado di mantenere le cellule ES in uno

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

stato indifferenziato (Ventura C.,2003). È anche evidente che Smad7 blocca l'attivazione delle R-SMADs, e/o compete con gli attivatori delle R SMADs, nella formazione di complessi eteromerici con Smad4 ed inibendo il differenziamento cardiaco in cellule pluripotenti (Itoh F, 2001). Quindi, l'effetto differenziativo del HBR può essere dato dalla sua capacità di sopprimere un ciclo di autoregolazione a feedback negativo esercitato dalle Smad inibitorie durante il periodo iniziale di upregolazione delle Smad1/4.

Infatti è stato recentemente dimostrato che embrioni di topi senza Smad7 muoiono in utero a causa di difetti multipli nello sviluppo cardiovascolare, suggerendo che Smad7 ha un ruolo importante nello sviluppo e nella funzione cardiaca in vivo (Chen Q., 2009) e che una volta che il fenotipo cardiaco è stabilito, Smad7 può anche avere un ruolo importante a livello dei cardiomiociti nella prevenzione del rimodellamento del tessuto del miocardio. Curiosamente, l'HBR nei primi giorni, durante la formazione dei corpi embrioidi da parte delle cellule ES GTR1, in cui c'è una massima induzione di Smad1/4, inibisce l'espressione genica e proteica di Smad7, mentre in un secondo tempo, quando le cellule si differenziano in cardiomiociti, invertite la sua azione contrastando il declino spontaneo dell'espressione della proteina Smad7. Queste osservazioni suggeriscono che l'HBR, regola finemente l'equilibrio delle diverse SMADs, per controllare l'omeostasi nel processo di differenziamento, nei passaggi iniziali ma anche sui cardiomiociti finali.

E' stato già dimostrato che l'HBR aumenta l'espressione di un numero di geni implicati nella sopravvivenza delle cellule staminali e/o impegnati nel differenziamento cardiaco con un'azione diretta dalle unità che lo compongono, in particolare BU e RA, sulla trascrizione nucleare (Lionetti V. 2010). Simile risultato è stato ottenuto con nuclear run-off Transcription Assay che ha rivelato l'aumento dell'mRNA della Smad4 suscitato dall'HBR, mediato a livello trascrizionale da BU e RA, ma non dall'estere misto intatto. Quindi l'azione a livello nucleare è dovuta all'idrolisi del suo complesso, con la liberazione del BU che determina il rimodellamento della cromatina inibendo la HDAC (Guh JY, 2003) e AR che influenza la trascrizione delle Smad.

E' stato precedentemente dimostrato che sia in cellule ES murine che hMSCs umane l'azione dell'HBR comprendeva un aumento dell'espressione genica di Nkx-2.5 (Ventura C. 2007). E' ormai evidente che nelle cellule progenitrici cardiache precoci, l'azione finale della cascata delle Smad si evidenzia con il legame di Smad4 in siti altamente conservati di Nkx-2.5

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

cardiac enhancer e che questo meccanismo è fondamentale per l'intero processo cardiogenico. Gli esperimenti di ChIP effettuati dimostrano che gli estratti nucleari da cellule di controllo e cellule trattate con HBR, generano un prodotto di amplificazione del sito Smad binding element (SBE) nel promotore di l'Nkx-2.5 e che la quantità di DNA amplificato ottenuto da estratti di nuclei delle cellule ES trattate con HBR è risultata significativamente superiore a quella derivata da nuclei delle cellule di controllo.

## **5.2 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI IN MODO ASSIMMETRICO A BASSA ENERGIA SPINGONO IL DIFFERENZIAMENTO CARDIACO, NEURONALE E MUSCOLO SCHELETRICO IN CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE**

### **5.2a RECF MODULANO L'ESPRESSIONE DEI GENI DEL DIFFERENZIAMENTO E DELLA STAMINALITÀ IN CELLULE ES GTRI**

E' stato studiato l'effetto del campo radioelettrico convogliato (RECF) prodotto dal REAC sulla stimolazione della trascrizione dei geni della cardiogenesi come la Prodynorphin, GATA4 e Nkx-2.5, della miogenesi scheletrica come MyoD, e della neurogenesi come Neurogenin1.

L'espressione dei geni d'interesse è stata valutata attraverso la real-Time PCR che ha rivelato un aumento significativo dell'espressione genica di Prodynorphin dopo 24 ore di esposizione al REAC, e rimanendo marcata ancora dopo 48 ore di trattamento (Fig. 9A).

È importante notare che, anche dopo che lo stimolo è stato sospeso l'aumento della trascrizione persiste anche fino a 7 giorni (Fig. 9A) L'effetto del REAC sulla trascrizione della Prodynorphin è degno di considerazione per la capacità di questo gene e del suo relativo prodotto la dinorfina B di controllare l'omeostasi del Ca<sup>2+</sup> citosolico, la contrattilità in cardiomiociti adulti (Ventura, C.; Guarnieri C.1991) (Ventura C., Capogrossi M.C.,1991), e di indurre la trascrizione di geni implicati nel differenziamento cardiaco in cellule ES attraverso l'attivazione di circuiti autocrini, (Ventura C., 2005), e intracrine segnalazioni nucleari da parte dei recettori degli oppioidi (Ventura C., 2003). Evidenziando il ruolo centrale del gene della Prodynorphin durante la cardiogenesi, le cellule ES trattate con il REAC mostrato un aumento significativo dell'espressione dei geni di GATA4 e Nkx 2,5 (Fig. 9B, C) che codificano rispettivamente per un zinc finger e un homeodomain essenziali per la

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

cardiogenesi in diverse specie animali compresi gli esseri umani (Biben C., 1991). La trascrizione di MyoD e Neurogenin1 è risultata significativamente aumentata con andamenti nel tempo simili la persistenza dopo la sospensione dello stimolo (Fig. 9D, E).

L'equilibrio tra il self-renewal e il differenziamento nelle cellule ES deve attentamente controllare la trascrizione di diversi fattori, tra cui Sox2, Nanog, e Oct 4 (Sun, Y.2006). Sox2 può agire in sinergia con Oct3/4 per attivare Oct-Sox enhancers, che regolano l'espressione di geni specifici in cellule staminali pluripotenti, compreso Nanog, Oct3/4 e Sox2 stessi. Nanog una volta espresso, blocca il differenziamento (Kashyap, V 2009), di conseguenza quando si attiva il differenziamento viene inibito (Chambers I. 2003). Durante le prime fasi del differenziamento delle cellule ES, dopo la rimozione del LIF, l'espressione di Sox2 è normalmente inibita (Fig. 10A), il trattamento con il REAC aumenta ulteriormente la downregolazione dei livelli di mRNA di Sox2, 24 ore dopo la rimozione del LIF (Fig. 10A). Simili risultati, anche se con un andamento temporale diverso sono stati prodotti dal RECF emesso dal REAC sull'espressione genica di Oct4 e Nanog (Fig. 10B, C).

## **5.2b EFFETTI DEI RECF SULL'ESPRESSIONE PROTEICA DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE ES GTR1**

Per valutare se le risposte osservate a livello della trascrizione genica rappresentano l'inizio di una resa maggiore di differenziamento è stato studiato l'effetto del REAC sull'espressione di un certo numero di proteine marker tessuto specifiche.

L'analisi con Western blot ha rivelato che i rappresentanti del differenziamento cardiaco, GATA4, neuronale,  $\beta$ -3-tubulina, e muscolo scheletrico, MyoD, sono significativamente più espressi nelle cellule ES trattate con il REAC rispetto alle cellule di controllo non trattate, con andamenti simili (Fig. 5A-C). L'aumento dell'espressione di queste proteine diventa evidente dopo 48 ore di trattamento, persistendo durante i 7 giorni successivi, anche in assenza di stimolazione (Fig. 11A-C). Nelle cellule esposte al REAC, l'espressione proteica di Sox2, e Nanog rispecchia l'espressione genica, con una downregolazione marcata, maggiore rispetto ai controlli non trattati con il REAC (Fig. 11D, E).

La sovraespressione di proteine marker tessuto-specifiche come l' $\alpha$  sarcomeric actinin e la MYC per il fenotipo cardiaco, Myogenin e MyoD per il muscolo scheletrico, e  $\beta$ 3 tubulin per quello neuronale, in cellule ES trattate con il REAC è stata confermata anche dall'analisi di microscopia confocale (Fig. 12). Evidenziando la capacità dei RECF di modulare il patterning delle proteine di cellule intatte. Il raggiungimento di un fenotipo cardiaco è stata ulteriormente dedotto dall'osservazione che il trattamento REAC determina un notevole aumento del numero delle colonie battenti spontanee (Fig. 12).

## **5.1c DISCUSSIONE**

I dati ottenuti dimostrano che l'orientamento del programma di differenziamento in cellule ES è influenzato dall'esposizione a campi radioelettrici convogliati direttamente localizzati nella coltura cellulare mediante le sonde immerse nel terreno di coltura e collegate all'emettitore dagli elettrodi

Diversamente dai campi magnetici a frequenza estremamente bassa, che spingono solo il differenziamento cardiaco nelle cellule ES (Ventura C. 2005), campi radioelettrici convogliati prodotti dal REAC orientano le ES verso tre fenotipi differenziativi cardio-neuro-muscolo scheletrico importanti per la medicina rigenerativa.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Sono in corso studi per svelare il profondo meccanismo molecolare alla base dell'azione dei campi radioelettrici convogliati prodotti dal REAC e per valutare se questo stimolo fisico può influenzare anche cellule staminali umane derivate da tessuto adiposo in vista di nuovi approcci di terapia cellulare.

### **5.3 CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI (RECF) RIPROGRAMMANO DIRETTAMENTE I FIBROBLASTI CUTANEI UMANI VERSO IL FENOTIPO CARDIACO-NEURONALE-MUSCOLO SCHELETRICO.**

#### **5.3a EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AI RECF SULLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E APOPTOSI IN FIBROBLASTI CUTANEI UMANI**

L'esposizione al REAC non ha avuto alcun effetto tossico sui HSFS, e non ha influenzato significativamente la quantità di cellule in apoptosi (Fig. 14B) o di cellule necrotiche (Fig. 14C), rispetto ai HSFS non trattati. La colorazione con Trypan blu non ha rilevato differenze significative della vitalità delle cellule esposte allo stimolo fisico rispetto alle cellule di controllo non esposte. E non vi è alcuna differenza significativa nel tasso di proliferazione cellulare tra i trattati e i controlli (Fig. 14A).

#### **5.3b I RECF INDUCONO L'ESPRESSIONE DEI GENI CARDIACI, NEURONALI E MUSCOLO SCHELETRICI**

I fattori di trascrizione: GATA4 (zinc-finger), TBX5 (della famiglia T-box) e MEF2C (myocyte enhancer factor2 della famiglia delle MADS) hanno un ruolo essenziale nel differenziamento cardiaco. Nello studio precedente sulle cellule ES GTR1 è stata dimostrata la capacità dei RECF di aumentare l'espressione dei geni cardiaci GATA4, Nkx2.5 e Prodynorphin, portando ad un alto rendimento delle colonie battenti spontanee.

In questo studio, è stato accertato che i campi radioelettrici convogliati sono in grado di orchestrare in fibroblasti (HSFS) una transizione verso il fenotipo cardiaco. Tale capacità è stata evidenziata con la Real-Time PCR e l'utilizzo di primers specifici per MEF2C, TBX5 e GATA4 che valutano il grado di espressione dei geni corrispondenti a 24, 48 e 72 ore con e senza trattamento con il REAC.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

L'espressione di MEF2C è 40 volte più elevata nei trattati rispetto ai controlli con un picco dopo 72 ore di trattamento (Fig. 15A) mentre l'espressione di TBX5 è significativamente aumentata dopo 48, e a 72 h risulta 50 volte più elevata rispetto ai controlli (Fig. 15B). L'espressione di GATA4 dopo 48 ore di trattamento REAC aumenta 15 volte di più rispetto ai controlli (Fig. 15C). Inoltre, le cellule trattate con REAC fino a 72 ore, e poi coltivate in assenza di stimolazione per un ulteriore periodo di 4 o 7 giorni, mostrano un ulteriore aumento dell'espressione di questi tre geni (Fig. 15). Questi risultati indicano che dopo l'esposizione al REAC è stato indotto un programma di differenziamento cardiaco sostenuto anche dall'aumento della trascrizione di Prodynorphin e Nkx2.5 (Fig. 16A, B), due geni profondamente coinvolti nella cardiogenesi in cellule staminali (Biben 1997). In particolare i livelli dell' mRNA di Nkx2.5 sono aumentati precocemente dopo 24 ore di trattamento, raggiungendo un aumento di 80 volte rispetto ai controlli dopo 72 ore, mentre i livelli di mRNA della Prodynorphin mostrano un significativo aumento durante le prime 72 ore di trattamento REAC, seguito da un ulteriore incremento dopo 7 giorni in coltura in assenza di stimolazione REAC (Fig. 16).

Nello studio precedente è stato dimostrato che l'esposizione al REAC porta all' induzione di geni che controllano il differenziamento neuronale e muscolo scheletrico, seguito dalla comparsa dei fenotipi corrispondenti, in cellule ES GTR1. Anche sui fibroblasti questo stimolo fisico induce l'espressione di Neurogenin1 che si evidenzia dopo 72 ore di trattamento, ed aumenta notevolmente dopo 4 giorni dalla sospensione dello stimolo risultando ben 200 volte più espressa nei trattati rispetto ai controlli (Fig. 16C).

I livelli di mRNA di MyoD sono 40 volte più alti nei trattati rispetto ai controlli dopo 72 ore di stimolazione, e dopo 4 giorni dalla rimozione dello stimolo superano ben 60 volte i livelli rilevati nei controlli non esposti (Fig. 16D).

### **5.3c ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA DEI DIFFERENZIAMENTI INDOTTI NEI HSFS**

Per confermare ulteriormente il differenziamento cardiaco, neuronale e muscolo scheletrico in fibroblasti cutanei umani coltivati in assenza o presenza dello stimolo prodotto dal REAC, è stata valutata la presenza di proteine marker tessuto specifiche su cellule intatte con l'analisi

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

di microscopia confocale, in presenza di anticorpi selezionati contro  $\alpha$ -sarcomeric actinin e  $\alpha$ -myosin

heavy chain per la cardiogenesi, MyoD per la miogenesi scheletrica, e  $\beta$ 3-tubulina per la neurogenesi. Come mostrato in figura 17, l'espressione di ogni proteina marker selezionata è evidente

solo nei fibroblasti esposti al REAC. L'analisi della citofluorimetria eseguita su HSFS trattati con il REAC per 72 ore e poi lasciati in coltura per altri 4 giorni senza lo stimolo, ha rivelato che  $16,30 \pm 1,8\%$  di cellule esprimono  $\beta$ 3-tubulina, mentre la percentuale di cellule positive a MyoD e  $\alpha$ -sarcomeric actinin è rispettivamente di  $21,60 \pm 2,20\%$ , o  $32,00 \pm 2,00\%$ , (media  $\pm$  SE; n = 6).

### **5.3d HSFS TRATTATI CON IL REAC DIRETTAMENTE RIPROGRAMMATI IN UNO STATO DI IPS PERSISTENTE**

I fattori di trascrizione Oct4, Sox2 e Nanog svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'identità delle cellule staminali. Queste proteine sono i regolatori principali dei geni del differenziamento che devono essere silenziati per mantenere lo stato di cellula staminale.

Analogamente, le fasi iniziali del differenziamento delle cellule staminali prevedono la downregolazione dell'espressione di Sox2. Vettori virali di trasduzione con Sox2, Oct4, Klf4 e c-Myc, inducono in HSFS lo stato intermedio di iPS, senza poterle riprogrammare direttamente in altri tipi di cellule differenziate (Takahashi K., 2007). La presenza dei geni con attivazione persistente, introdotti nelle cellule con i vettori virali è associata a una efficienza di differenziamento molto bassa (Takahashi K., 2007).

Nel caso delle HSFS trattate con il REAC, il time-course dell'analisi sull'espressione genica di Oct4, Sox2, cMyc, Nanog, e Klf4 è a intervalli molto più brevi rispetto agli altri geni analizzati. I dati ottenuti evidenziano che il trattamento con il REAC ha suscitato una risposta bifasica che comprende: un iniziale aumento dell'espressione genica durante le prime 6-20 ore, seguito da una sottoregolazione dopo 24 ore (Fig. 18A-E). Tale declino persiste dopo 72 ore di esposizione, essendo ancora ben evidente anche quando le cellule sono state mantenute in coltura per ulteriori 4 o 7 giorni in assenza dello stimolo (Fig. 18A-E). Questi risultati indicano che il trattamento con il REAC può determinare una riprogrammazione che prevede un passaggio iniziale transitorio allo stato di cellula pluripotente indotta (iPS), e il

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico



successivo allo stato di cellula differenziata, in tal modo si evita una diminuzione dell'efficienza del differenziamento dovuta a un lungo periodo di sovraespressione dei geni correlati alla staminalità.

### **5.3e II DIFFERENZIAMENTO MEDIATO DAL REAC AVVIENE PER UNA SELETTIVA INDUZIONE DELLA SUBUNITÀ NOX4 DELLA NADPH OSSIDASI**

Studi precedenti hanno evidenziato un ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel meccanismo della trasduzione del differenziamento cardiovascolare in cellule ES di topo sotto stimoli meccanici o elettrici (Schmelter, M., 2006) (Serena E.;2009). Il differenziamento cardiaco è stata accompagnata da un upregolazione dell'espressione delle isoforme Nox2 e Nox4 della NADPH ossidasi (Bartsch C., 2011).

I HSFS esposti al REAC mostrato un aumento dell'espressione genica di NOX4 tempo-dipendente, che ha raggiunto un massimo a 7-10 giorni in cellule che dopo 72 ore di trattamento sono state lasciate in coltura per altri 4-7 giorni (Fig. 19A). Diversamente dalla Nox4, l'espressione di Nox1 è downregolata durante le prime 72 ore di trattamento REAC, mentre aumenta dopo altri 7 giorni in coltura senza ulteriori trattamenti (Fig. 19B). Questi risultati hanno bisogno di una conferma sul ruolo dei ROS nel differenziamento indotto dallo stimolo prodotto dal REAC nei HSFS. Tale possibilità è dedotta dalla constatazione che tutte le risposte cellulari indotte dal REAC sono annullate quando le cellule sono state coltivate in presenza di N-(2-mercapto-propionil)-glicina (NMPG), uno scavenger di radicali liberi dell'ossigeno (Fig.17).

### **5.3f DISCUSSIONE**

Nel complesso i risultati ottenuti indicano una modulazione tempo dipendente dell'espressione dei fattori di trascrizione che dirigono il differenziamento verso specifici fenotipi, in HSFS riprogrammati per l'azione dei campi radioelettrici convogliati prodotti dal REAC. Finora, una notevole complessità è stato rilevato nei profili di espressione di questi fattori di trascrizione, con inaspettate azioni multidirezionali, mostrate ad esempio, dalla capacità di Nkx2.5 di guidare non solo il differenziamento cardiaco ma anche quello neuronale e muscolo scheletrico in cellule ES (Riazi, A. M. 2005). Decifrare il meccanismo molecolare che collega le unità trascrizionali che intervengono nella reazione mediata dallo stimolo del REAC nei

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

HSFS può fornire un finestra temporale nel circuito cellulare che giustifica il conseguimento dei destini multipli da parte di queste cellule.

## 5.4 CONCLUSIONI

Lo scopo della biologia rigenerativa è l'identificazione delle diversità cellulari e molecolari che distinguono il normale turnover tissutale della riparazione cicatriziale, al fine di ricreare un ambiente adatto alla rigenerazione in un tessuto adulto danneggiato.

Tale compito può essere raggiunto identificando la sorgente cellulare capace di rigenerare al meglio il tessuto danneggiato e il milieu più adatto per ospitare e istruire le cellule.

Il destino delle cellule staminali è controllato da più regolatori intrinseci e dal contesto della matrice extracellulare. In vitro con adeguate condizioni di coltura, le cellule staminali possono differenziarsi spontaneamente in varie tipi cellulari, inclusi i cardiomiociti. Tuttavia la cardiogenesi, spontanea è generalmente inefficiente anche in cellule ES, ottenendo un contesto di cellule differenziate e indifferenziate, che non è adatto per gli approcci di terapia cellulare.

L'espansione e la differenziazione in vitro sia delle cellule staminali embrionali che adulte sono in genere gestiti con dei cocktail di fattori di crescita o attraverso manipolazioni genetiche. Pertanto, sono necessari metodi più efficienti e selettivi per guidare i meccanismi molecolari di segnalazione che orchestrano il differenziamento delle cellule staminali.

L'utilizzo dell'HBR, un composto sintetico che offre la possibilità di influenzare a livello molecolare una delle famiglie principali dei trasduttori di segnale le SMADs, può ottimizzare la cardiogenesi nelle cellule staminali senza il bisogno di utilizzare vettori virali mediante la tecnologia di trasferimento genico che non sono immediatamente applicabili nella pratica clinica.

Ma per la terapia cellulare c'è bisogno di cellule autologhe del paziente da curare, quindi sono state sottoposte a campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico di 2,4 GHz secondo un preciso protocollo, cellule somatiche come i fibroblasti cutanei umani HSFS ricercando l'opportunità di riprogrammarle in uno stato intermedio di cellula staminale pluripotente indotta, e poi di orientarle verso fenotipi cellulari funzionali.

I HSFS possono essere riprogrammati con lo stimolo dei RECF verso i tre profili differenziativi cardiaco, neuronale e muscolo scheletrico che sono stati a lungo perseguiti come obiettivo principale per una nuova prospettiva futura della medicina rigenerativa per la cura di malattie cardiovascolari, neurodegenerative e disturbi neuromuscolari.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

Questa strategia renderebbe disponibile ad uso clinico cellule derivate dal paziente stesso in grado di integrarsi nel tessuto danneggiato, dopo l'esposizione all'agente fisico per un periodo di tempo limitato.

## BIBLIOGRAFIA

**Ales Cvekl ,Wei-Lin Wang,** *Retinoic acid signaling in mammalian eye development* Exp Eye Res.; 89(3): 280–291 September(2009).

**Al-Hajj M., Becker M.W., Wicha M., Weissman I., Clarke M.F.***Therapeutic implications of cancer stem cells.*Curr Opin Genet Dev. 14(1):43-7 Feb (2004).

**Al-Toma A., Verbeek W.H., Mulder C.J.** *Update on the management of refractory coeliac disease.* J Gastrointestin Liver Dis. 16(1):57-63 Mar (2007).

**Al-Toma A., Visser O.J., van Roessel H.M., von Blomberg B.M., Verbeek W.H., Scholten P.E., Ossenkoppele G.J., Huijgens P.C., Mulder C.J.** *Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory celiac disease with aberrant T cells.* Blood.1;109(5):2243-9. Oct 26 (2006).

**Alvarez C.V., Lavandeira M. G., et al***Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells* Journal of Molecular Endocrinology 49, R89–R111(2012).

**Alviano F., Fossati V., Marchionni C., et al***Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro* BMC Developmental Biology 7:11(2007).

**Andressen C., Arnhold S., Puschmann M., et al.***Beta1 integrin deficiency impairs migration and differentiation of mouse embryonic stem cell derived neurons.* Neurosci Lett 251:165–8(1998).

**Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB***Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart.* Mol Cell Biol 13: 2235–2246(1993).

**Attisano L, Wrana JL***Smads as transcriptional co-modulators.* Curr Opin Cell Biol 12: 235–243(2000).

**Bartha J.L., Romero-Carmona R., Comino-Delgado R., Arce F., Arrabal J.***Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid.* Obstet Gynecol 96, 588-592(2000).

**Baschat, A. A., and Hecher, K.** *Fetal growth restriction due to placental disease.* Semin Perinatol 28, 67-80 (2004).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

**Benirschke K., Kaufmann P.** *Anatomy and pathology of the umbilical cord.* In: Springer, ed. *Pathology of the human placenta.* New York (2006).

**Berry D.C., and Noy N.** *All-trans-Retinoic Acid Represses Obesity and Insulin Resistance by Activating both Peroxisome Proliferation-Activated Receptor  $\beta/\delta$  and Retinoic Acid Receptor* *Molecular and cellular biology* 29, 3286-3296 (2009).

**Binas B.** *Embryo-derived stem cells a system is emergin* *BMB Rep*; 42(2): 72-80 (2009).

**Blair K., Wray J., Smith A.** *The Liberation of Embryonic Stem Cells* *PLoS Genetics* Volume 7 , Issue 4 ,e1002019 (2011).

**Bodmer R.** *The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila.* *Development* 118: 719–729(1993).

**Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., et al** *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells* *Science* 16 January (1998).

**Bonaguidi M.A., McGuire T., Hu M., Kan L., Samanta J., Kessler J.A.,** *LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP expressing cells.* *Development*, Vol 132, no 24, pp 5503-5514(2005).

**Borggreffe T., Oswald F.,** *The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes* *Cell Mol. Life Sci*, Vol 66, no 10, pp 1631– 1646 (2009).

**Brambrink T., R. Foreman, G. G. Welstead et al.,** “*Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells,*” *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 2, pp.151–159, (2008).

**Brons I.G.M, Smithers L.E, Trotter M.W.B., Rugg-Gunn P., Sun B., et al.** *Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos.* *Nature* 448: 191–195 (2007);

**Caplan A.I.** *Mesenchymal Stem Cells* *Journal of Orthopaedic Research* 9:6 4 1- 4 5 0 Raven Press, Ltd., New York 0 (1991).

**Cartwright P., McLean C., Sheppard A., Rivett D., Jones K., Dalton S.** *LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism.* *Development* 132(5):885-896; (2005).

**Cavallari G, Olivi E, Bianchi F, and Ventura C.** *Mesenchymal stem cells and islet co-transplantation in diabetic rats: improved islet graft revascularization and function by human*

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

*adipose tissue-derived stem cells preconditioned with natural molecules*. cell transplant. apr 2(2012).

**Chen WW, Blurton-Jones M.** *Concise Review: Can Stem Cells be Used to Treat or Model Alzheimer Disease?* Stem Cells. Sep (2012).

**Chepko G., Slack R., Carbott D., et al.** *Differential alteration of stem and other cell populations in ducts and lobules of TGF $\alpha$  and c-Myc transgenic mouse mammary epithelium.* Tissue Cell 37:393–412(2005).

**Chew, J. L., Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W. L., Yeap, L. S., Li, P.; Ang, Y. S.; Lim et al,** *Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells.* Mol. Cell. Biol. 25(14):6031-6046; (2005).

**Chomczynsky P., and Sacchi N.** Anal. Biochem 162,156-159,(1982).

**Collis L., Hall C., Lange L., et al** Rapid hyaluronan uptake is associated with enhanced motility: implications for an intracellular mode of action FEBS Letters 440 444^449(1998).

**Coradini D, Pellizzaro C, Miglierini G, Daidone MG, Perbellini A.** Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the anti proliferative activity on a breast cancer cell line. Int. J Cancer; 81 (3): 411-6, (1999).

**D'Ippolito G., Schiller P. C., Perez-Stable C., Balkan W., Roos B. A., Howard, G. A.** Cooperative anabolic actions of hepatocyte growth factor and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in osteoblastic differentiation of human vertebral bone marrow stromal cells. Bone 31, 269-275. (2002).

**Danese S, Fiocchi C.** Ulcerative colitis. N Engl J Med. 3;365(18):1713-25 Nov (2011 ).

**D'Angelo B., Benedetti E., Di Loreto S., Cristiano L., Laurenti G., et al** Signal transduction pathways involved in PPAR $\beta/\delta$ -induced neuronal differentiation J Cell Physiol 226, 2170-2180 (2011).

**Darby, I.A. Hewitson T.D.,** Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. Int Rev Cytol, 257: p. 143-79(2007).

**De Coppi P, Callegari A, et al** Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. J Urol. 177(1): 369-76. (2007).

**De Coppi P., Bartsch G., Jr. Siddiqui M.M., Xu T., Santos C.C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A.C., Snyder E.Y., Yoo J.J., et al.** Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol 25, 100-106 (2007).

**DECRETO 26 aprile 2002** Gazzetta Ufficiale serie generale del 7 maggio 2002, pagine 68-73.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

**Desmouliere, A., Redard M., Darby I., Gabbiani G.** Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.*, 146(1): p. 56-66(1995).

**Dobbin E., Graham C., Corrigan P.M. Thomas K.G., Freeburn R.W., Wheadon H.** Tel/PDGFRbeta induces stem cell differentiation via the Ras/ERK and STAT5 signaling pathways. *Exp. Hematol.* 37(1):111-121; (2009).

**Evans M.J., Kaufman M.H.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.*; 292(5819): 154-6 (1981).

**Fortier R.A.** Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications *Vet Surg.*;34(5):415-23 Oct (2005).

**Frey A.H.** Electromagnetic field interactions with biological systems. *The FASEB Journal* 7:272-281 Feb (1993).

**Fuchs E., Tumber T., Guasch G.** Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116: 769-78(2004).

**Gangaram-Panday S.T., Faas M.M., de Vos P.** Towards stem-cell therapy in the endocrine pancreas. *Trends Mol Med.*;13(4):164-73. Feb 20 (2007).

**Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriya IS, Yamagishi H, Srivastava D.** Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev Biol.* 235(1):62-73 (2001).

**Germain P., Chambon P., Eichele G., et al** International Union of Pharmacology. LX. Retinoic Acid Receptors *Pharmacol Rev* 58, 712-725 (2006).

**Giabor J.J. Orv. Hetil.,** Stem cells in the amniotic fluid: the new chance of regenerative medicine, 152, 581-587 (2011).

**Goldberg J.S., Hirschi K.K.,** Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche. *Regen Med*, Vol 4, no 6, pp 879-897(2009).

**Guo J, Li ZC, Feng YH.** Expression and activation of the reprogramming transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 25;390(4):1081-6 Dec (2009).

**Gurdon J.B.** The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles *J. Embryo, exp. Morph.*, Vol. 10, Part 4, pp. 622-40 December (1962).

**Haeckel E.** *Naturliche schopfungsgeschichte* Georg Reimer Berlin (1868).

**Hasselblatt P, Drognitz K, Potthoff K, Bertz H, Kruis W, Schmidt C, Stallmach A, Schmitt-Graeff A, Finke J, Kreisel W.** Remission of refractory Crohn's disease by high-dose cyclophosphamide and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Aliment Pharmacol Ther.*;36(8):725-35 (2012).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



**Hattori N, Imao Y, Nishino K, Hattori N, Ohgane J, Yagi S, Tanaka S, Shiota K.** Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells*.12(3):387-96 Mar (2007).

**He X.C., Zhang J., Tong W.G., et al** BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling *Nat Genet.*;36(10):1117-21 Oct (2004).

**Hevernan C., H. Sumer, and P. J. Verma,** "Generation of clinically relevant induced pluripotent stem (iPS) cells," in *Pluripotent Stem Cells*, D. W. Rosales and Q. N. Mullen, Eds., pp.81–112, Nova Publishing, New York, NY, USA, 1st edition, (2009).

**Heretsch P., Tzagkaroulaki L., Giannis A., Bioorg** Modulators of the hedgehog signaling pathway *Med Chem Review*, Vol 18, no 18, pp 6613-6624 (2010).

**Herrera D.G., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.,** Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol*, Vol 46, no, pp 867-877(1999).

**Hinz, B., et al.,** The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, . 170(6): p. 1807-16(2007).

**Hirabayashi Y., Itoh Y., Tabata H., Nakajima K., Akiyama T., Masuyama N., Gotoh Y.,** The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*, Vol 131, no 12, pp 2791-2801(2004).

**Hirsch E., Iglesias A., Potocnik A.J., Hartmann U., Fassler R.** Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* 380:171–5(1996).

**Hoehn H., Bryan E.M., Fantel A.G., Martin G.M.** Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. III. The fetal urine as a potential source of clonable cells. *Humangenetik* 29, 285-290 (1975).

**Hoover B.A., Muschler G.,** Beta-catenin mediated Wnt signaling as a marker for characterization of human bone marrow-derived connective Tissue Progenitor Cells. *Journal of young investigators*, Vol. 12, no 5, (2005).

**Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., et al**

**In't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., Noort W. A., Claas F.H., Willemze R., Fibbe W.E., Kanhai H.H.** Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548-1549(2003).

**Iwata T., Kawamoto T., Sasabe E., et al** Effects of overexpression of basic helix–loop–helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells *European Journal of Cell Biology* Volume 85, Issue 5, Pages 423–431, 3 May (2006).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

**Jensen U.B., Lowell S., Watt F.M.** The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis *Development* 126, 2409-2418 (1999).

**Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM.** Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.*; 30(8): 896-904(2002);

**Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM.** Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.* 30(8): 896-904(2002);

**Kalluri R., Zeisberg M.** Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(5): p. 392- 401(2006);

**Kashyap, V.; Rezende, N. C.; Scotland, K. B.; Shaffer, S. M.; Persson, J. L.; Gudas, L. J.; Mongan, N. P.** Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* 18(7):1093-1108; (2009).

**Kastner P., Grondona J.M., Mark M., Gansmuller A., LeMeur M., Decimo D., Vonesch J.L., et al** Retinal dysplasia and degeneration in RAR $\beta$ 2/RAR $\gamma$ 2 compound mutant mice *Development* 122, 2173-2188 (1996).

**Kliemt S, Lange C, Otto W, Hintze V, Möller S, von Bergen M, Hempel U, Kalkhof S.** Sulfated hyaluronan containing collagen matrices enhance cell-matrix-interaction, endocytosis, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *J Proteome Res.* Nov 21(2012).

**Korz-Sleptsova I.L., Lindstrom E., Mild K.H., Berglund A., Lundgren E.** Low frequency MFs increased inositol 1,4,5-trisphosphate levels in the Jurkat cell line. *FEBS Lett* 359:151–154(1995).

**Krebsbachl P.H., Kuznetsov S.A., Bianco P.,** Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application *Crobn* 10: 165 (1999).

**Kuzan A, Chwiłkowska A, Kobielarz M, Pezowicz C, Gamian A.** Glycation of extracellular matrix proteins and its role in atherosclerosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* Oct 29 (2012).

**Lajtha L.G.** *Stem Cell Concepts* Differentiation 14, 23-34 (1979).

**Laurent T. C., Laurent U. B. G., Fraser J.R.E.** Functions of hyaluronan *Annals of the Rheumatic Diseases*; 54: 429-432(1995).

**Legge del 19 febbraio 2004, n°40 Art. 13** *Gazzetta Ufficiale* N. 45 del 24 Febbraio (2004).

**Li L., Neaves W.B.** Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche *Matters Cancer Res*; 66: (9). May 1 (2006).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

- Li L., Xie T.** Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:605-31(2005).
- Li Q., Ford M.C., Lavik E.B., Madri J.A.,** Modeling the neurovascular niche: VEGF and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *J Neurosci Res*, Vol 84, no 8, pp 1656-1668 (2006).
- Li W., LoTurco J.J.,** Noggin is a negative regulator of neuronal differentiation in developing neocortex. *Dev Neurosci*, Vol 22, no 1-2, pp 68-73(2000).
- Liboff A. R.** Toward an Electromagnetic Paradigm for Biology and Medicine. *The journal of alternative and complementary medicine* Volume 10, Number 1, pp. 41–47(2004).
- Liboff AR.** Electric-field ion cyclotron resonance. *Bioelectromagnetics.* 18:85-87(1997).
- Lindvall O., Kokaia Z., Martinez-Serrano A.** Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl, S42-50 (2004).
- Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP** Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119: 419–431(1993).
- Lionetti V, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Valente S, et al.** Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid affording myocardial survival and repair without stem cell transplantation. *J Biol Chem* 285:9949–9961(2010).
- Ma D.K., Marchetto M.C., Guo J.U., Ming G.L., Gage F.H., Song H.,** Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*, Vol 13, no 11, pp 1338-1344 (2010).
- Mackay A.M., Beck S.C., Murphy J.M., Barry F.P., Chichester C.O., Pittenger M.F.** Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* Winter;4(4):415-28(1998).
- Maioli M, Asara Y, Pintus A, Ninniri S, Bettuzzi S, et al.** Creating prodynorphin-expressing stem cells alerted for a high-throughput of cardiogenic commitment. *Regen Med* 2: 193–202(2007).
- Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Gualini S, Fontani V, Ventura C.** Radio frequency energy loop primes cardiac, neuronal, and skeletal muscle differentiation in mouse embryonic stem cells: a new tool for improving tissue regeneration. *Cell Transplant.* 22 Sep (2011).
- Maioli, M.; Santaniello, S.; Montella, A.; Bandiera, P.; Cantoni, S.; Cavallini, C.; Bianchi, F.; Lionetti, V.; Rizzolio, F.; Marchesi, I. Et al.** Hyaluronan esters drive Smad gene expression and signaling enhancing cardiogenesis in mouse embryonic and human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 5(11):e15151; (2010).
- Manni V, Lisi A, Rieti S, Serafino A, Ledda M, Giuliani L, Sacco D, D'Emilia E, Grimaldi S.** Low electromagnetic field (50 Hz) induces differentiation on primary human oral keratinocytes (HOK). *Bioelectromagnetics.*;25(2):118-26 Feb (2004).
- Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico  
Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

**Manni V., Lisi A., Pozzi D., Rieti S., et al** Effects of extremely low frequency (50 Hz) magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes. *Bioelectromagnetics*. 23(4):298-305 May (2002).

**Martin G.R.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;78(12):7634-8. Dec (1981).

**Massague´ J., Chen Y.G.** Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14:627–644(2000).

**McCreary C.R., Dixon S.J., Fraher L.J., Carson J.J., Prato F.S.** Real-time measurement of cytosolic free calcium concentration in Jurkat cells during ELF magnetic field exposure and evaluation of the role of cell cycle. *Bioelectromagnetics* 27(5):354-64 (2006).

**Medina-Gomez P., del Valle M.** The culture of amniotic fluid cells. An analysis of the colonies, metaphase and mitotic index for the purpose of ruling out maternal cell contamination. *Ginecol Obstet Mex* 56, 122-126 (1988).

**Mellor A.L., Munn D.H.** Immunology at the maternal fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol* 18, 367-391 (2000).

**Nakagawa M., M. Koyanagi, K. Tanabe et al.,** “Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts,” *Nature Biotechnology*, vol. 26, no. 1, pp.101–106, (2008).

**Nuccitelli R .** **Endogenous ionic currents and DC electric fields in multicellular animal tissues.***Bioelectromagnetics*. ;Suppl 1:147-57(1992).

**Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ.** Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*. 122(8): 2339-48 (1996).

**Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P., Bilic G., Buhring H.J. Evangelista M., Hennerbichler S., Liu B., Magatti M., Mao N., et al..** Isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *concise review stem cells*. (2007).

**Pazianos G., Uqoezwa M., Reya T.** The elements of stem cell self-renewal: a genetic perspective *BioTechniques* 35:1240-1247 December (2003).

**Péault B., Huard J., et al** Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy *Mol Ther*.15(5):867-77 May (2007).

**Piscaglia A.C.** Stem cells, a two-edged sword: Risks and potentials of regenerative medicine *World JGastroenterol* 14(27): 4273-4279 July 21(2008).

**Portmann-Lanz C.B., Schoeberlein A., Huber A., Sager R., Malek A., Holzgreve W., Surbek D.V.** Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*, 194(3):664-673(2006).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

**Prusa A.R., Hengstschlager M.** Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit* 8, RA253-257(2002).

**Pumiglia K., Temple S.**, PEDF: Bridging neurovascular interactions in the stem cell niche. *Nat Neurosci*, Vol 9, no 3, pp 299-300 (2006).

**Rajasingh J, Bord E, Hamada H, Lambers E, Qin G, et al.** STAT3-dependent mouse embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes: analysis of molecular signaling and therapeutic efficacy of cardiomyocyte precommitted mES transplantation in a mouse model of myocardial infarction. *Circ Res* 101: 910–918 (2007).

**Ramirez-Castillejo C., Sanchez-Sanchez F., Andreu-Agullo C., Ferron S.R., Aroca-Aguilar J.D., Sanchez P., Mira H., Escribano J., Farinas I.**, Pigment 92epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*, Vol 9, no 3, pp 331-339 (2006).

**Rawls, A.; Morris, J. H.; Rudnicki, M.; Braun, T.; Arnold, H. H.; Klein, W. H.; Et al** Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* 172(1):37-50; (1995).

**Rinaldi S., Fontani V., et al** A new approach on stress-related depression e anxiety: neuro-Psycho-Physical-Optimization with Radio Electric Asymmetric-Conveyer *Indian J Med Res* 132 (2010).

**Rose L.F., Rosemberg E.** Bone graft and growth and differentiation factors for regenerative therapy: a review. *pract proced aesthet dent*;13(9):725-734 (2001).

**Sauvageau G., Thorsteinsdottir U., Eaves C. J., et al.** Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 9: 1753-1765(1995).

**Scintu F., Reali C., Pillai R., et al** Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments *BMC Neuroscience*, 7:14 (2006).

**Sell S.** Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33: 738-750(2001).

**Sengupta A., Tyagi R.K. and Datta K.** Truncated variants of hyaluronan-binding protein 1 bind hyaluronan and induce identical morphological aberrations in COS-1 cells *Biochem. J.* 380, 837–844(2004).

**Shachar M.,Cohen S.** Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors. *Heart Fail Rev*;8:271-276 (2003).

**Shen H, Huang G, Hadi M, Choy P, Zhang M, et al.** Transforming growth factor-b1 downregulation of Smad1 gene expression in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G539–G546(2003).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

**Shuiliang Yu, Liraz Levi, Ruth Siegel, Noa Noy,** Retinoic acid induces neurogenesis by activating both retinoic acid receptors (RAR) and peroxisome proliferator-activated receptor $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ) The American Society for Biochemistry and Molecular Biology (2012).

**Smith AG** Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 435–462(2001).

**Sridharan R., Tchieu J., Mason M. J. et al.,** “Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency,” *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 364–377, (2009).

**Stadtfield M., N. Maherali, D. T. Breault, and K. Hochedlinger,** “Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse,” *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 3, pp.230–240, (2008).

**Sucov H.M., Dyson E., Gumeringer C.L., Price J., Chien K.R., and Evans R.M.** RXRa mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis *Genes Dev.* 8, 1007–1018 (1994).

**Takahashi K.,Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors *Cell* 131 (5): 861-872 Nov(2007).

**Takahashi K., Yamanaka S.** Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors *Cell* ;126(4):663-76 Aug 25( 2006).

**Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.** Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors *Cell.* 131(5):861-72Nov 30(2007).

**Takemoto T., Uchikawa M., Kamachi Y., Kondoh H.,** Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development*, Vol 133, no 2, pp 297-306(2006).

**Tandon N., Cannizzaro C., Chao P.H.G.,bet al** Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering *Nat Protoc.* 4(2): 155–173 (2009).

**Tang D.Q., Cao L.Z., Burkhardt B.R., Xia C.Q., Litherland S.A., Atkinson M.A., Yang L.J.** In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes.* 53(7):1721-32 Jul (2004).

**Tesar P.J., Chenoweth J.G, Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., et al.** New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448: 196–199 (2007).

**The International Society for Cellular Therapy:** Clarification of the nomenclature forMSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7(5):393-395(2005).

**Thomson J.A, Kalishman J, Golos T.G, Durning M, Harris C.P, Becker R.A, Hearn J.P.** Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(17): 7844-8 (1995).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

**Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., et al** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts *Science*: Vol. 282 no. 5391 pp. 1145-1147 6 November (1998).

**Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282(5391): 1145-7(1998).

**Till J.E. and Mcculloch E.A.** A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells *Radiation Research* 14, 213-222 (1961).

**Till J.E., Mcculloch E.A., And Siminovitch L.** A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells *Pnas* 51(1): 29-36 Jan (1964).

**Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A.** Myofibroblasts and mechano regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(5): p. 349-63 (2002).

**Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J., Hwang S.M.** Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 19, 1450-1456 (2004).

**Ventura C, Maioli M** Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ Res* 87: 189–194(2000).

**Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Maioli M** Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase c activation to the transcription of cardiogenic genes in gtr1 embryonic stem cells. *Circ Res* 92: 623–629(2003).

**Ventura C., Cantoni S., Bianchi F., and Perbellini A.** Hyaluronan Mixed Esters of Butyric and Retinoic Acid Drive Cardiac and Endothelial Fate in Term Placenta Human Mesenchymal Stem Cells and Enhance Cardiac Repair in Infarcted Rat Hearts *The journal of biological chemistry* vol. 282, no. 19, pp. 14243–14252, may 11, (2007).

**Ventura C., Maioli M., Asara Y., et al** Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields *The FASEB Journal* 19(1):155:157; (2005).

**Ventura C., Maioli M., Asara Y., et al** Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan a novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells *The journal of biological chemistry* Vol. 279, No. 22, Issue of May 28, pp. 23574–23579, (2004).

**Ventura C., Maioli M., Asara Y., Santoni D., Mesirca P., Remondini D., Bersani F.** Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields *Faseb J* 19(1):155:157(2005).

**Ventura C., E. Zinellu, E. Maninchedda, M. Fadda, M. Maioli** Protein Kinase C Signaling Transduces Endorphin-Primed Cardiogenesis in GTR1 Embryonic Stem Cells *Circulation Research* (2003).

**Verfaillie C. M., Pera M. F., Lansdorp P. M.** Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 369-391(2002).

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

- Verfaillie, C. M.**. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol* 3, 314-317 (2002);
- Wang H, Yang GH, Bu H, Zhou Q, Guo LX, et al.** Systematic analysis of the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line RD. *Int J Exp Path* 84: 153–163(2003).
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, et al.** A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 25: 681–686. (2007).
- Weissman I.L.** Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution *Cell*, Vol. 100, 157–168, January 7, (2000).
- Wheatley S.C., Isacke C.M. and Crossley P.H.**, Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning *Development* 119, 295-306 (1993).
- Wu X., Burgess S.M.** Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell Mol Life Sci* 61, 2588-2596(2004).
- Yamanaka S.** Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future *Cell Stem Cell* 10, June 14, (2012).
- Young H.E., Duplax C., Ramos M.R.** Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering *Cell Biochemistry and Biophysics* 40 (2004).
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I., Thomson J.A.** Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells *Science*;318(5858):1917-20 Dec 21(2007).
- Zechner D., Fujita Y., Hülken J., Müller T., Walther I., Taketo M.M., Crenshaw E.B. 3rd, Birchmeier W., Birchmeier C.**, beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev. Biol*, Vol 258, no 2, pp 406-418(2003).
- Zhao Y., Wang H., Mazzone T.** Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. *Exp Cell Res.* 1;312(13):2454-64 Aug (2006).
- Zheng B., Huard J., Péault B., et al** Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol.* 25(9):1025-34 Sep (2007).

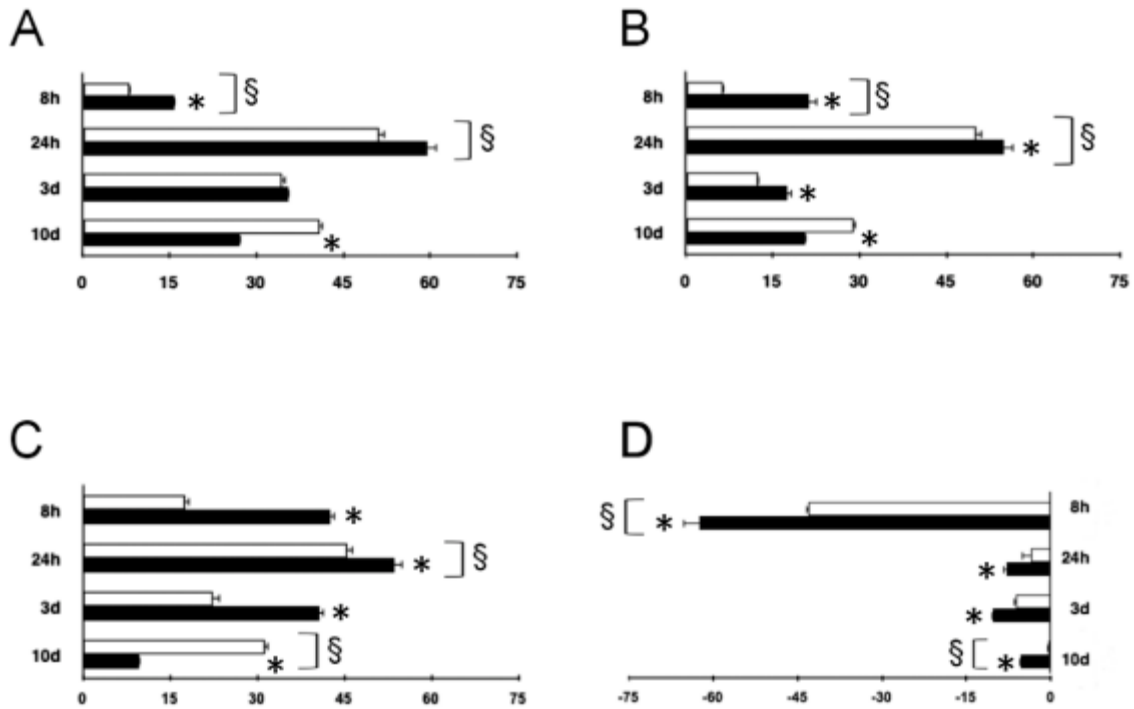


# FIGURE

## HBR e GTR1-FMhMSCs

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica

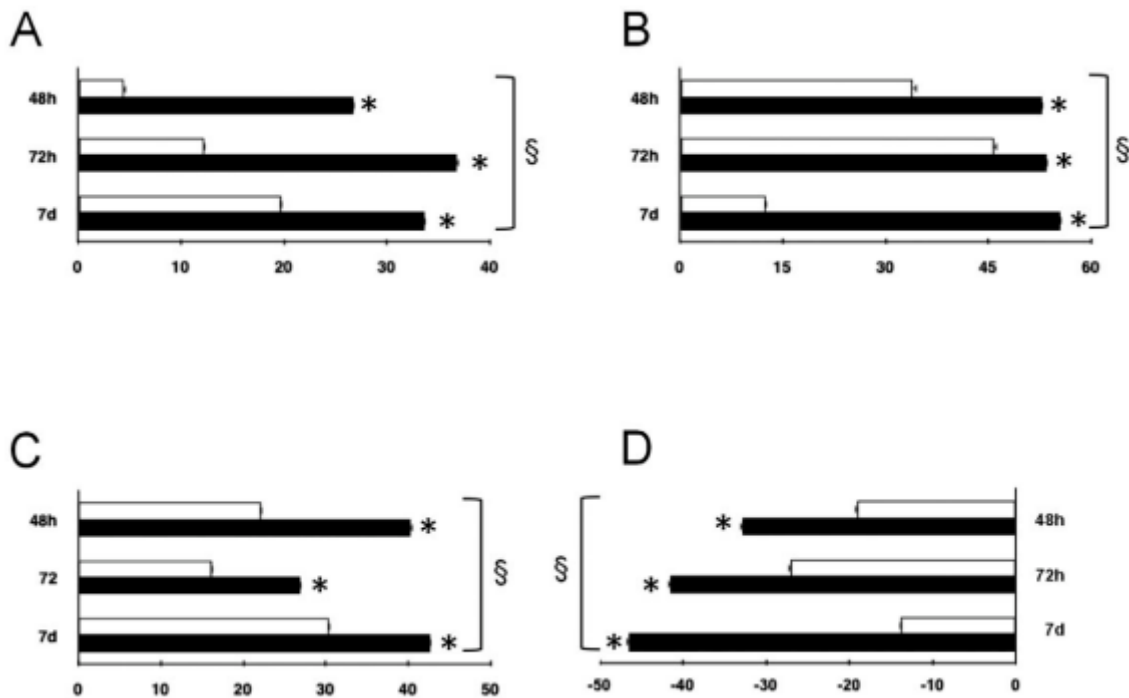


**Fig. 1** Time-course dell'espressione genica delle Smad nelle GTR1

Le cellule sono state coltivate per 8-24 ore, 3 giorni (Ebs) o 10 giorni (cardiomiociti selezionati con puromicina) in presenza/assenza di HBR (1,5 mg/ml). L'espressione dell'mRNA di ciascuna Smad: Smad1 (A), Smad3 (B), Smad4 (C) e Smad7 (D) di cellule non trattate (istogramma bianco) o trattate con HBR (istogramma nero) è stata normalizzato con GAPDH e graficata come fold change rispetto all'espressione dell' mRNA al time 0 (momento in cui è stato rimosso il LIF) definito come 1 (mean 6 S.E.; n = 6).

\*, significativamente differente dal gruppo non trattato;

§, significativamente differente rispetto agli altri gruppi (Tukey's test).

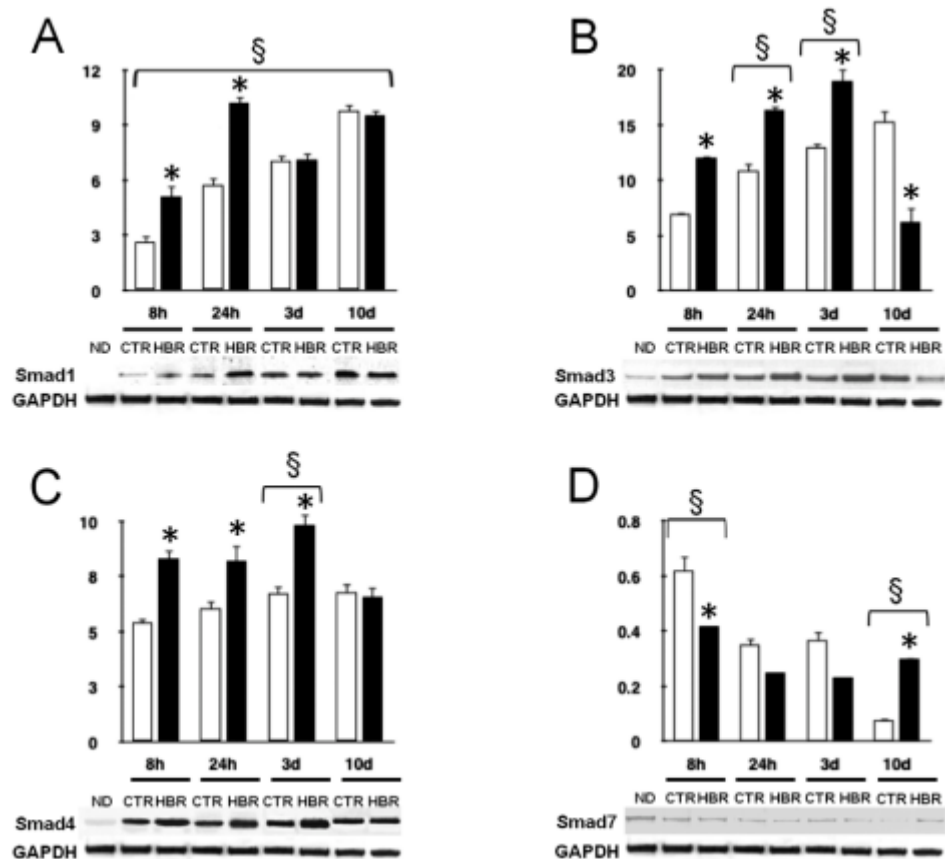


**Fig. 2** Effetto dell'HBR sull'espressione genica di Smad nelle FMhMSCs.

Le cellule sono trattate per 7 giorni in assenza (istogramma bianco) o presenza (istogramma nero) di HBR (1.5 mg/ml). Per l'analisi in real-time (RT-PCR) l'espressione di ciascun mRNA Smad1 (A), Smad3 (B), Smad4 (C) e Smad7 (D) è stata normalizzata rispetto al GAPDH e graficata come fold change rispetto all'espressione dell'mRNA al time0 definito come 1 (mean  $\pm$  6 S.E.; n = 6).

\*, significativamente differente dal gruppo non trattato;

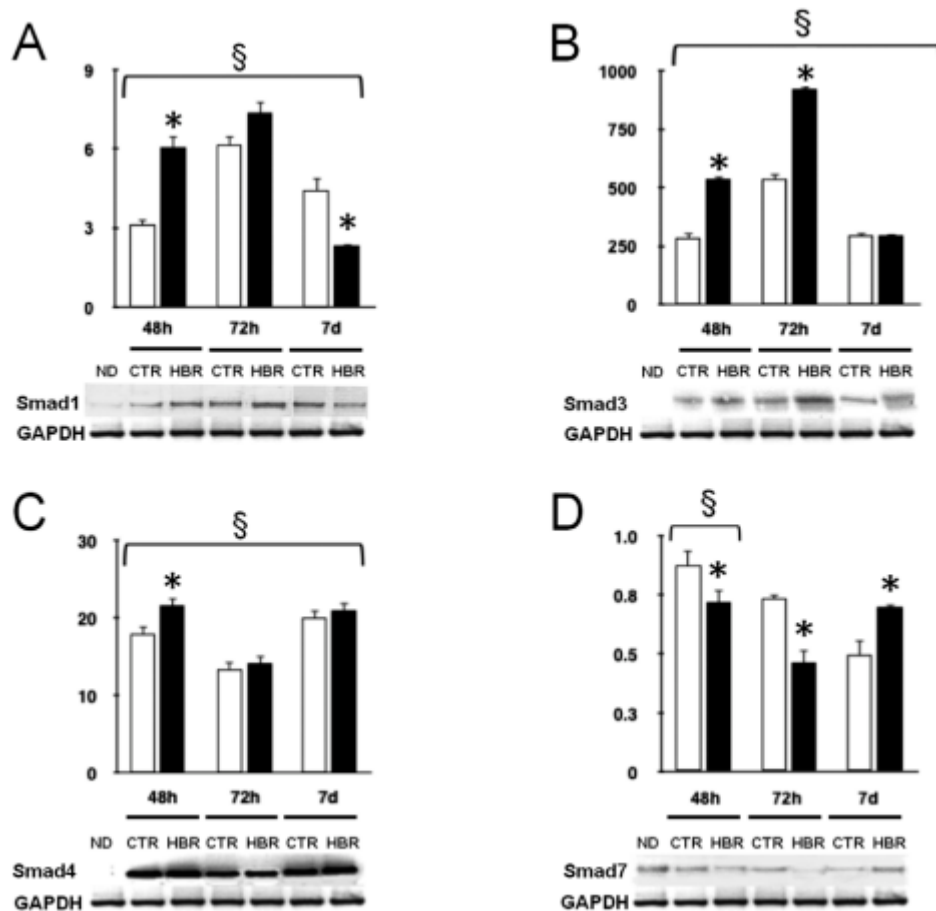
§, significativamente differente rispetto agli altri gruppi (Tukey's test).



**Fig. 3** Effetto dell'HBR sull'espressione proteica delle Smad durante il differenziamento delle cellule ES GTR1. Il lisato cellulare è stato ottenuto da GTR1 indifferenziare (ND) nel momento in cui è stato rimosso il LIF (time 0), da EBs (8 ore, 24 ore, e 3 giorni), e cardiomiociti selezionati da ES trattate con puromicina (10 giorni) coltivate in assenza (CTR, istogramma bianco) o presenza (HBR, istogramma nero) di 1.5 mg/ml HBR. I campioni sono stati analizzati con il Western blot usando un anticorpo policlonale anti Smad1 (A), Smad3 (B), Smad4 (C), and Smad7 (D). La dimensione delle bande è determinata in funzione di un marker proteins. L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software della Quantity one (BioRad). I dati sono riportati come espressione relativa alle cellule ND e normalizzata sui livelli di espressione di GAPDH (mean 6 S.E.; n = 6).

\*, significativamente differente dal gruppo non trattato;

§, significativamente differente rispetto agli altri gruppi (Tukey's test).

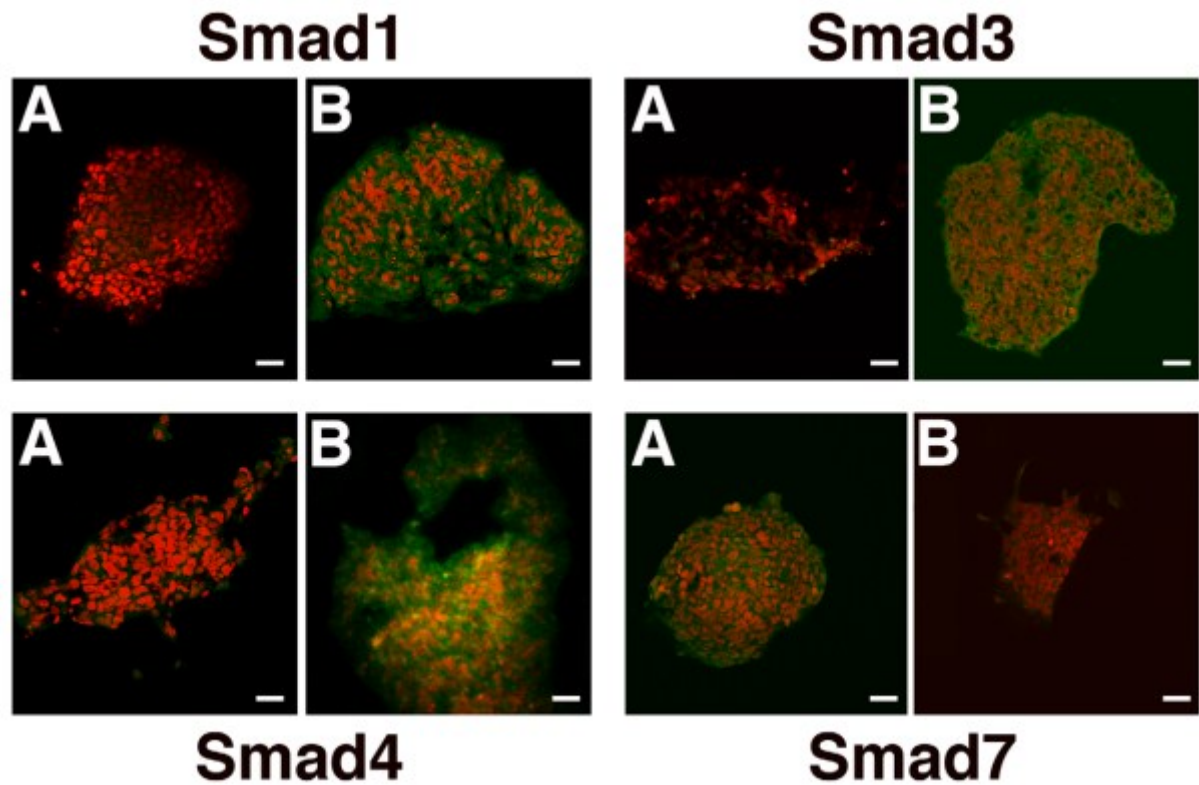


**Fig 4** Effetto dell'HBR sull'espressione proteica delle Smad durante il differenziamento dell'FMhMSCs. Il lisato cellulare è stato ottenuto al time 0 (ND) considerato come tempo al quale le cellule raggiungono una confluenza dell'80% al 3° passaggio, o da FMhMSCs coltivate in tempi diversi in assenza (CTR, istogramma bianco) o presenza di 1.5 mg/ml HBR (HBR, istogramma nero). I campioni sono stati analizzati con il Western blot usando un anticorpo policlonale anti Smad1 (A), Smad3 (B), Smad4 (C), and Smad7 (D). La dimensione delle bande è determinata in funzione di un marker proteins. L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software della Quantity one (BioRad).

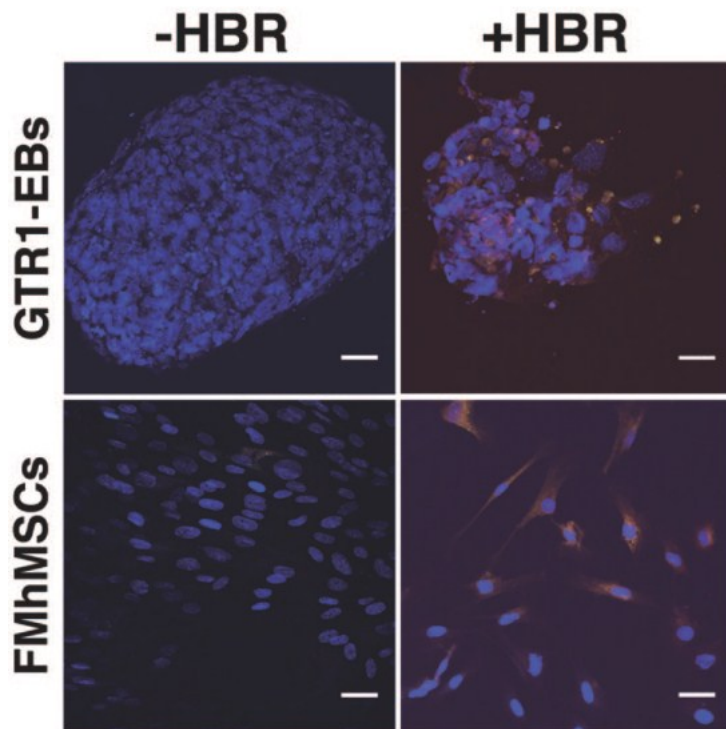
I dati sono riportati come espressione relativa alle cellule ND e normalizzata sui livelli di espressione di GAPDH (mean 6 S.E.; n = 6).

\*, significativamente differente dal gruppo non trattato;

§, significativamente differente rispetto agli altri gruppi (Tukey's test).



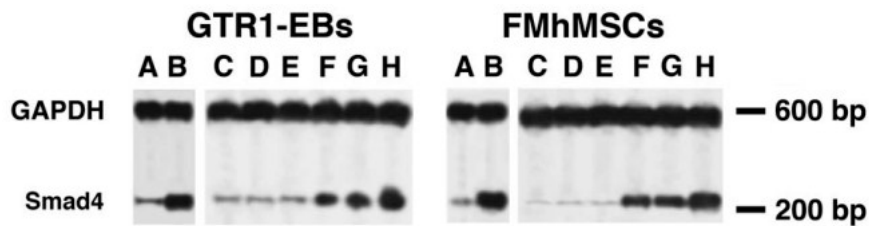
**Fig. 5** L'HBR modula l'espressione proteica delle Smad in cellule GTR1 ES. L'espressione proteica delle Smad1,3,4, e 7 è stata osservata nelle cellule (EBs) coltivate per 48 ore in assenza (A) o presenza (B) di HBR (1.5 mg/ml). La Scala bars è di 40 μm. I nuclei sono colorati con Propidium Iodide (rosso).



**Fig.6** Analisi di immunofluorescenza dell'espressione dell'  $\alpha$ -sarcomeric actinin e Smad4 in cellule GTR1 ES e FMhMSCs.

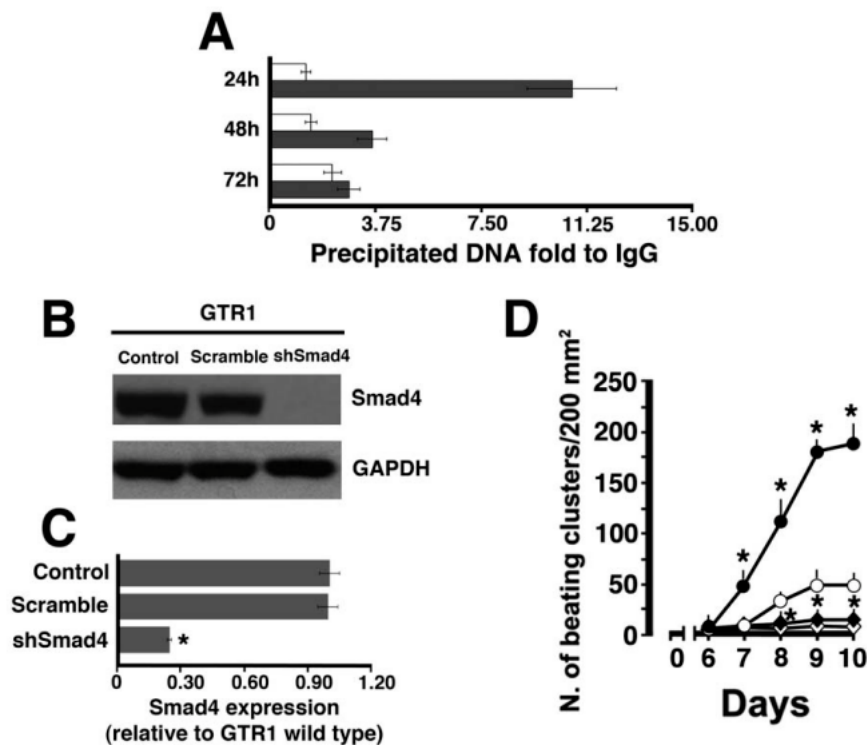
L'espressione contemporanea di  $\alpha$ -sarcomeric actinin [(FITC) immunofluorescenza verde] e Smad4 [(rhodamine) immunofluorescenza rossa] è stata osservata in cellule (EBs) derivate da GTR1 o FMhMSCs coltivate rispettivamente per 3 o 7 giorni in assenza o presenza di 1.5 mg/ml HBR. Scala bars di 40  $\mu$ m.

I nuclei sono colorati con DAPI (blu).



**Fig.7** Analisi della trascrizione del gene Smad4 in nuclei isolati da corpi embrioidi di GTR-1 o FMhMSCs coltivati per 24h in assenza (A) o presenza (B) di 1.5 mg/ml HBR. Dalla linea C a H i nuclei sono stati isolati da cellule non trattate e incubate direttamente per 12h senza alcuna sostanza (C) , in presenza di 2.0 mg/ml HBR (D), di 5 mg/ml acido ialuronico (HA) (E), di 2.5 mM acido butirrico (BU) (F), di 10<sup>-8</sup> M acido retinoico (RA) (G), combinazione di acido butirrico (BU) a acido retinoico (RA) (H). Esposizione autoradiografica per 2 giorni su Kodak X-Omat con intensifying screen. La parte destra del pannello riporta la posizione di marker di DNA radioattivi dimostrando che i frammenti singoli migrano con una dimensione molecolare paragonabile a Smad4 (268 basi), o mRNA di GAPDH (597 basi).





**FIG.8** Il legame della Smad4 sul gene Nkx-2.5 è cruciale per la cardiogenesi mediata da HBR.

(A) L'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) è stata eseguita con anticorpi antiSmad4 sulla cromatina ottenuta da cellule ES GTR1, coltivate in assenza (controlli) o presenza di 1.5mg/ml di HBR (HBR) a diverse ore del differenziamento. Il DNA precipitato è stato amplificato con real-time PCR usando primer per il promotore Nkx-2.5. Il DNA Input è stato utilizzato come riferimento, e il normal IgG immunoprecipitated DNA per la calibrazione.

(B) Il legame del Lentiviral-mediated Smad4 shRNA determina un silenziamento consistente dell'espressione della proteina Smad 4 in cellule GTR1 ES. Il scrambled shRNA è stato utilizzato come controllo negativo. I campioni sono stati analizzati con Western blot con anticorpi policlonali anti Smad4. La dimensione della banda è stata determinata con il marker proteico.

(C) La Real-time PCR dell'espressione genica di Smad4 in GTR1 ES cells si evidenzia con l'assenza (controllo, wild type) o presenza di Smad4 o scrambled shRNA. I dati riportano la relativa espressione in cellule GTR1 wildtype (media 6 S.E.; n = 6). \* significativamente different dal wild type. (D) Analisi delle colonie selezionate con la puromicina ottenute da cellule ES GTR1 wild type o da cellule sottoposte al silenziamento di Smad4 per trasfezione con lentivirus Smad4 shRNA. Dal momento in cui è stato rimosso il LIF si è proceduto con selezione mediante puromicina per 4 giorni in entrambi i gruppi cellulari, trattati/non trattati (cerchi e rombi, rispettivamente wild type e Smad4-silenced) in presenza di 1.5 mg/ml HBR (cerchi e rombi, rispettivamente wild type e Smad4-silenced) (mean 6 S.E.; n = 6).

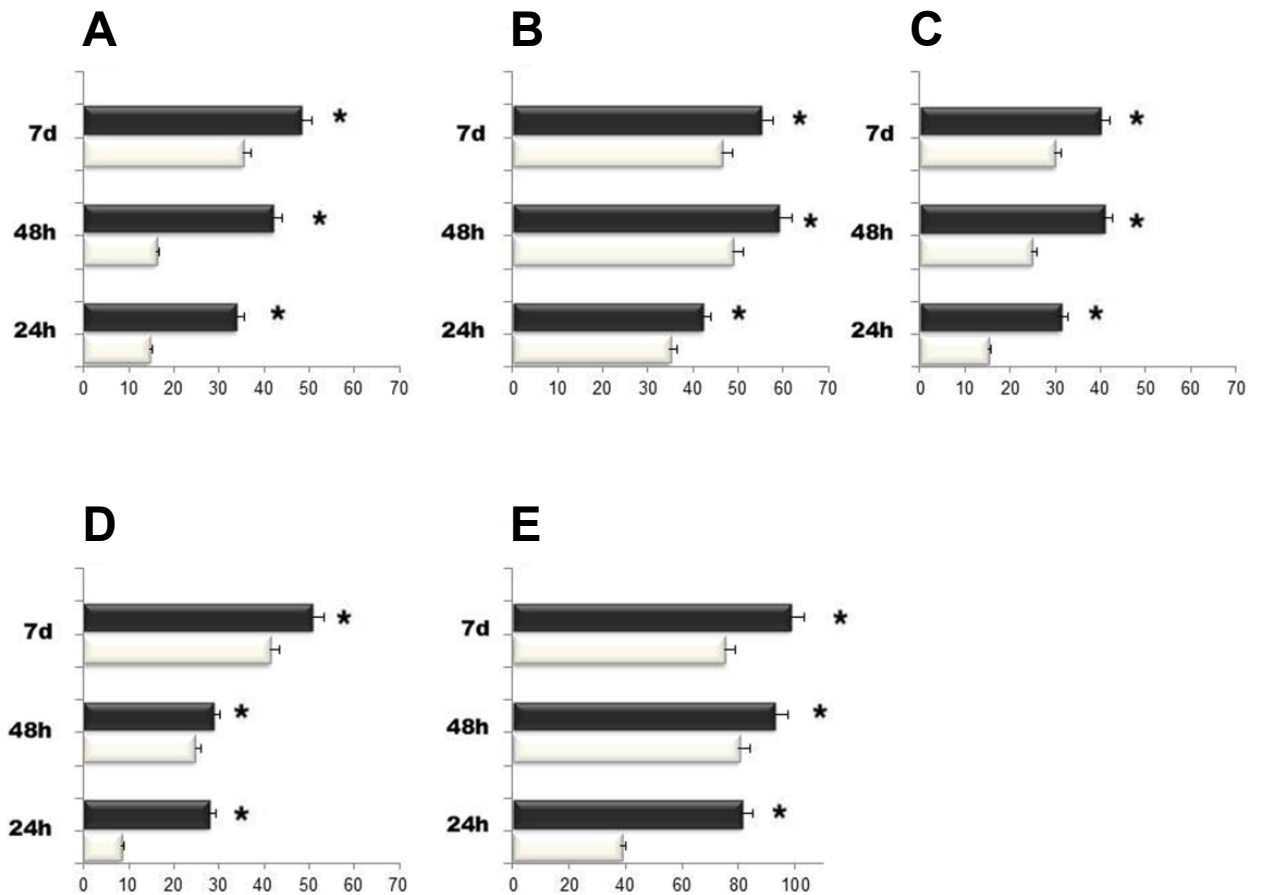
\*, significativamente differenti rispetto a cellule wild type non trattate.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

## **REAC e ES R1**

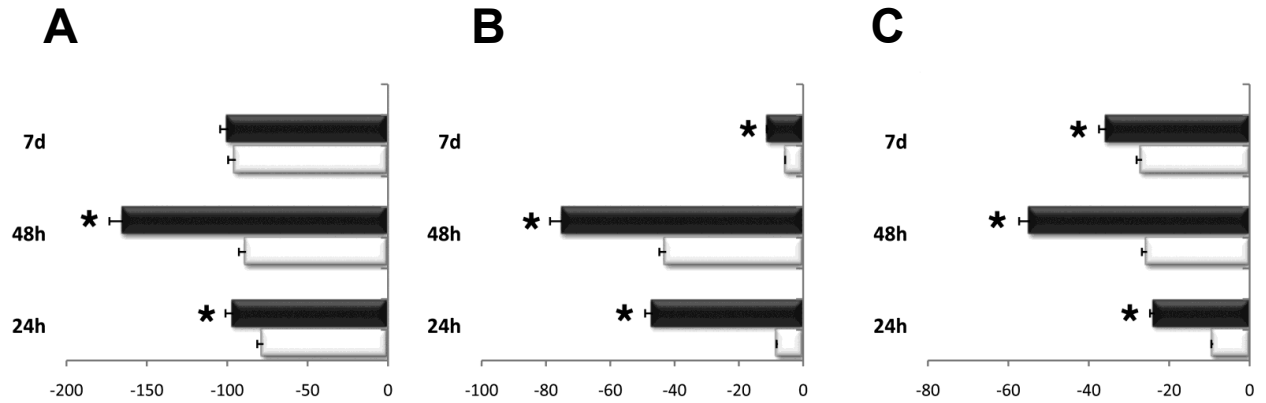
**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



**Fig. 9.** Effetto della stimolazione REAC nell'espressione dei geni orchestranti il commitment cardiogenico, muscolare scheletrico e neurogenico nelle cellule staminali embrionali. La timeline dell'esperimento prevede l'esposizione delle cellule per 24 o 48 ore (EBs: corpi embrioidi), al REAC (istogrammi neri) o senza lo stimolo REAC (istogrammi bianchi), o coltivate per 7 giorni dopo le 48 ore dalla formazione dei corpi embrioidi in presenza (istogrammi neri) o assenza (istogrammi bianchi) dello stimolo REAC. I profili di espressione genica della prodynorphin (A), GATA4 (B), Nkx-2.5 (C), MyoD (D) e NGN1 (E) dell'mRNA di cellule non trattate (istogramma bianco) o trattate con il REAC (istogramma nero) sono stati normalizzati con glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e graficati come fold change rispetto all'espressione di mRNA in cellule non differenziate nel momento in cui è stato rimosso il LIF (time 0), definito come 1 (media  $\pm$  S.E.; n=6).

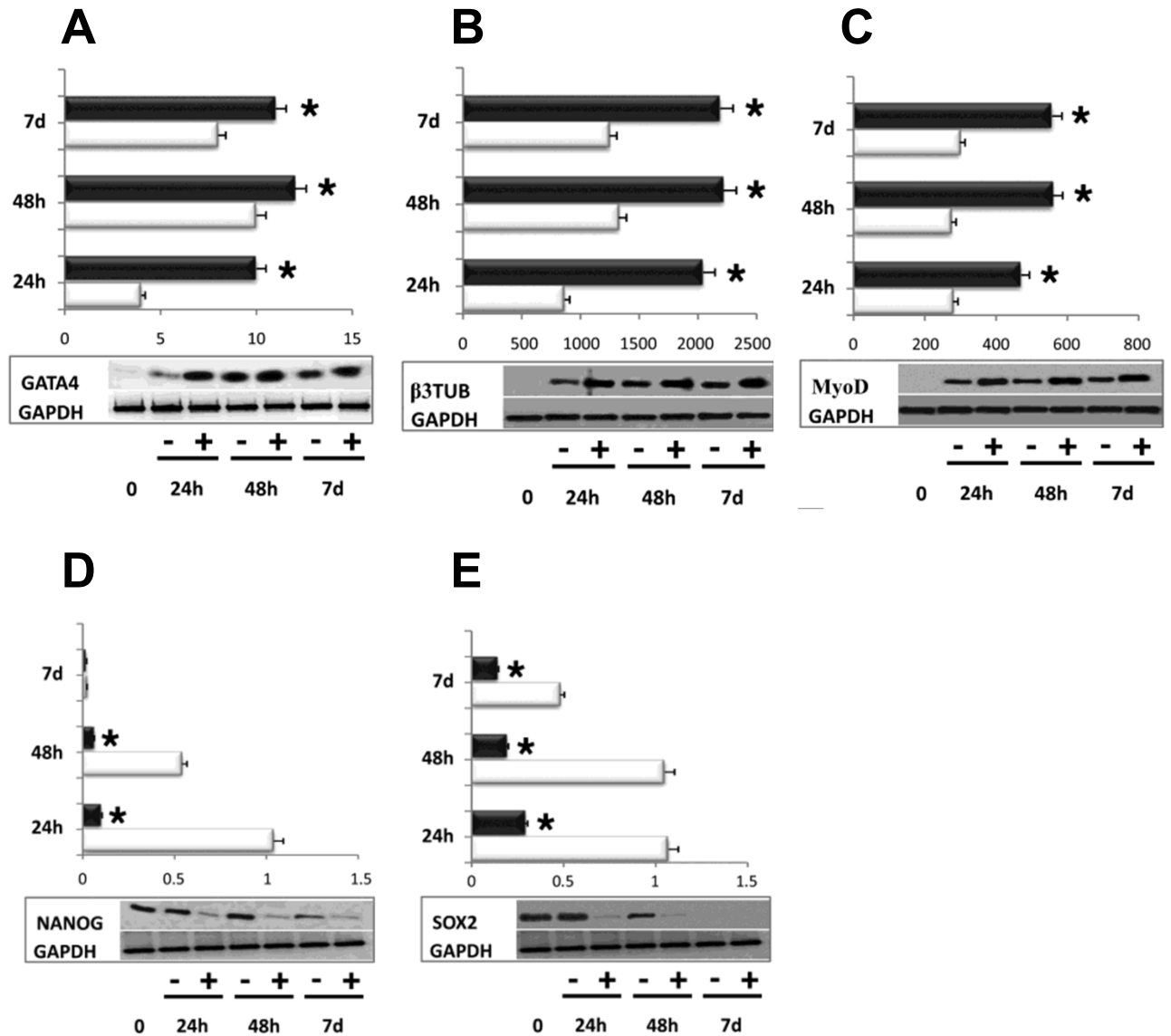
\*, differenza significativa rispetto alle cellule non trattate.



**Fig. 10.** La stimolazione del REAC downregola l'espressione dei marker caratteristici di cellule Staminali Embrionali indifferenziate.

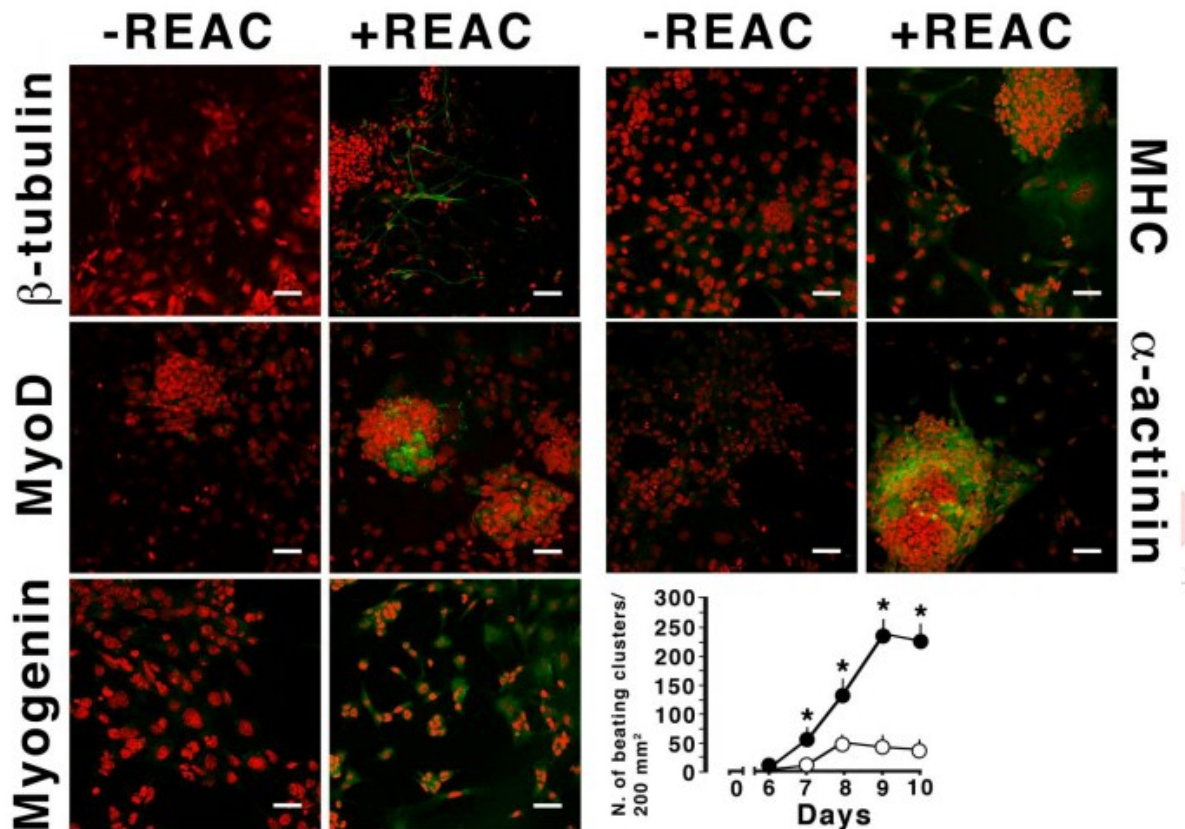
La timeline dell'esperimento prevede l'esposizione delle cellule per 24 o 48 ore (EBs: corpi embrioidi), al REAC (istogrammi neri) o senza lo stimolo REAC (istogrammi bianchi), o coltivate per 7 giorni dopo le 48 ore dalla formazione dei corpi embrioidi in presenza (istogrammi neri) o assenza (istogrammi bianchi) dello stimolo REAC. I profili di espressione genica della sex determining region Y-box 2 [Sox2] (A), octamer binding protein 4 [Oct4] (B) e Nanog (C) dell'mRNA di cellule non trattate (istogrammi bianchi) o trattate con il REAC (istogrammi neri) sono stati normalizzati con GAPDH e graficati come fold change rispetto all'espressione di mRNA in cellule non differenziate nel momento in cui è stato rimosso il LIF (time 0), definito come 1 (media  $\pm$  S.E.; n=6).

\*, differenza significativa rispetto alle cellule non trattate.



**Fig. 11.** L'esposizione delle cellule ES al REAC modula l'espressione di specifiche proteine. Il lisato cellulare è stato ottenuto da cellule R1 indifferenziate al time 0 (momento in cui è stato rimosso il LIF), da EBs (24 ore, 48 ore), coltivate in assenza (istogrammi bianchi) o presenza (istogrammi neri) dello stimolo REAC, o coltivate per 7 giorni dopo le 48 ore dalla formazione dei corpi embrioidi in presenza (istogrammi neri) o assenza (istogrammi bianchi) dello stimolo REAC. I campioni sono stati analizzati con la tecnica analitica del Western blot, usando un anticorpo policlonale anti GATA4, (A) β-3-tubulin (B), MyoD (C), Sox2 (D) e Nanog (E). Le dimensioni delle bande sono state determinate con un marker proteico pregraduato. L'analisi densitometrica è stata determinata utilizzando un software specifico: il Quantity one (BioRad). I dati sono riportati come espressione relativa in cellule indifferenziate e normalizzati sul livello di espressione del GAPDH (mean ± S.E.; n=6). \*, differenza significativa rispetto alle cellule non trattate.

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico



**Fig. 12.** Differenziamento mediato da REAC in cellule ES.

L'espressione delle proteine  $\beta$  3 tubulina, MyoD, Myogenina, Myosin Heavy chain (MHC), e  $\alpha$ actinin è stata saggiata in cellule ES trattate con il REAC per 48 ore, e lasciate in coltura per altri 5 giorni per l'immunofluorescenza. La barra di riferimento è pari a 40  $\mu$ m.

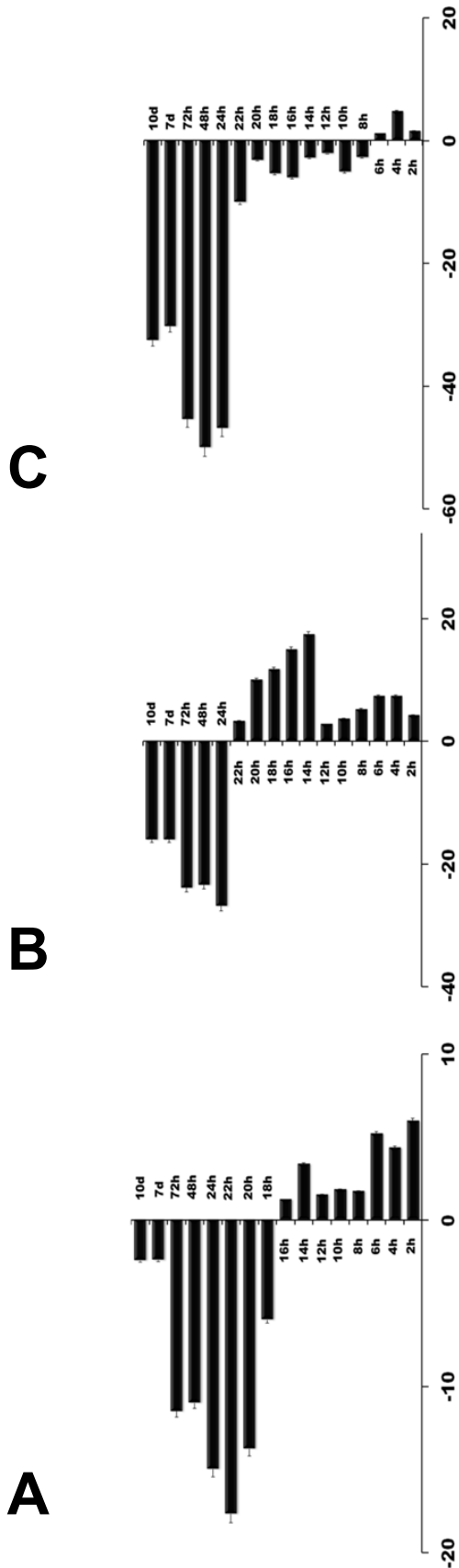
I nuclei sono marcati con propidium iodide (rosso). Sono mostrati 5 separati esperimenti rappresentativi. Il grafico mostra l'analisi dei corpi contrattili ottenuti dalle cellule dopo la rimozione del LIF, trattate con il REAC per 48 ore (cerchi neri) e in assenza di REAC (cerchi vuoti). È riportata la media  $\pm$ S.E.; n=6

\*indica le differenze significative

## **REAC e HFF1**

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

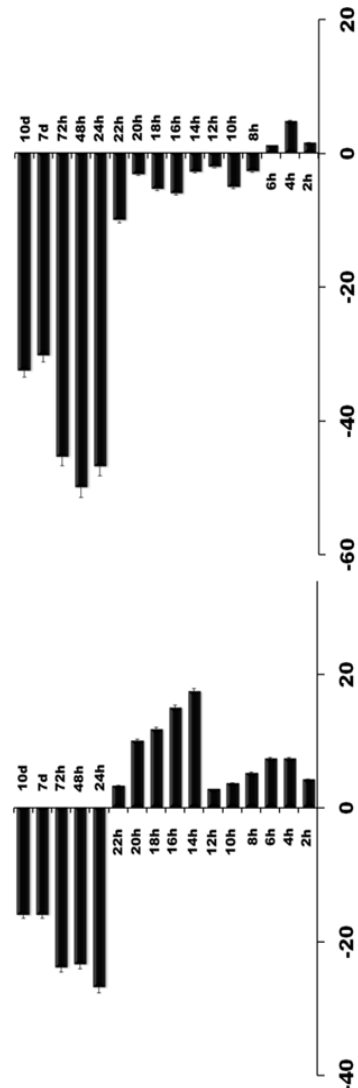
Sc. Dot. Scienze Biomediche; ind. Genetica Medica malattie metaboliche e nutrigenomica



C

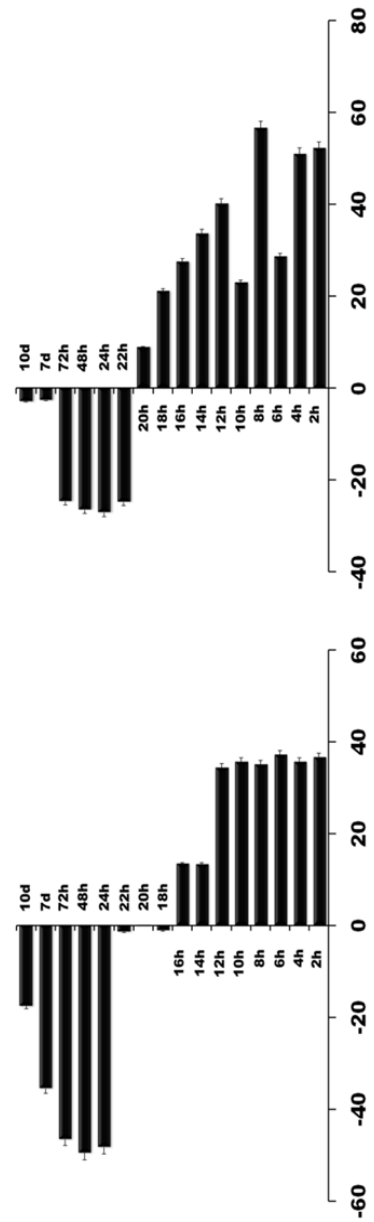
B

A



E

D



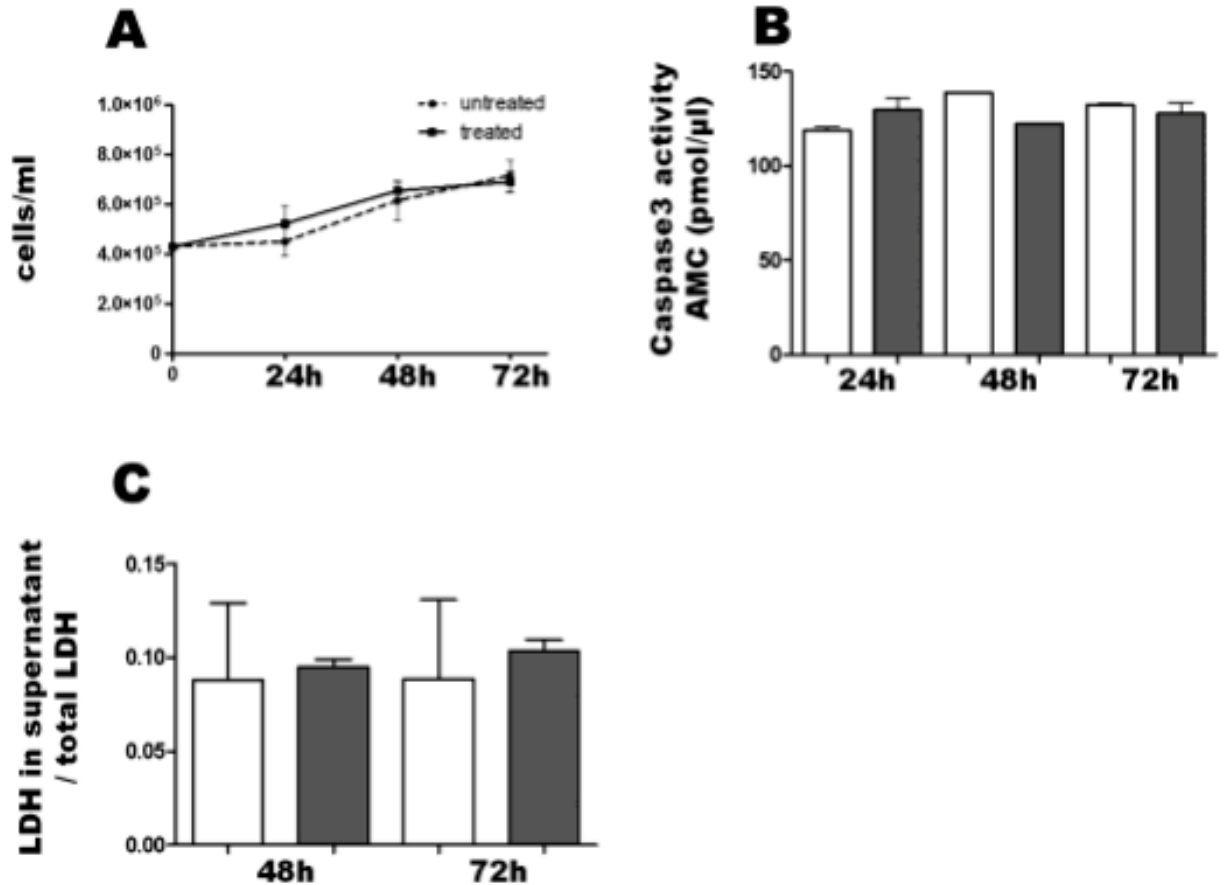
Sara Santaniello Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico



**Fig. 13.** Il trattamento REAC in funzione del tempo di esposizione, modula l'espressione dei geni della staminalità riprogrammando i fibroblasti verso iPS.

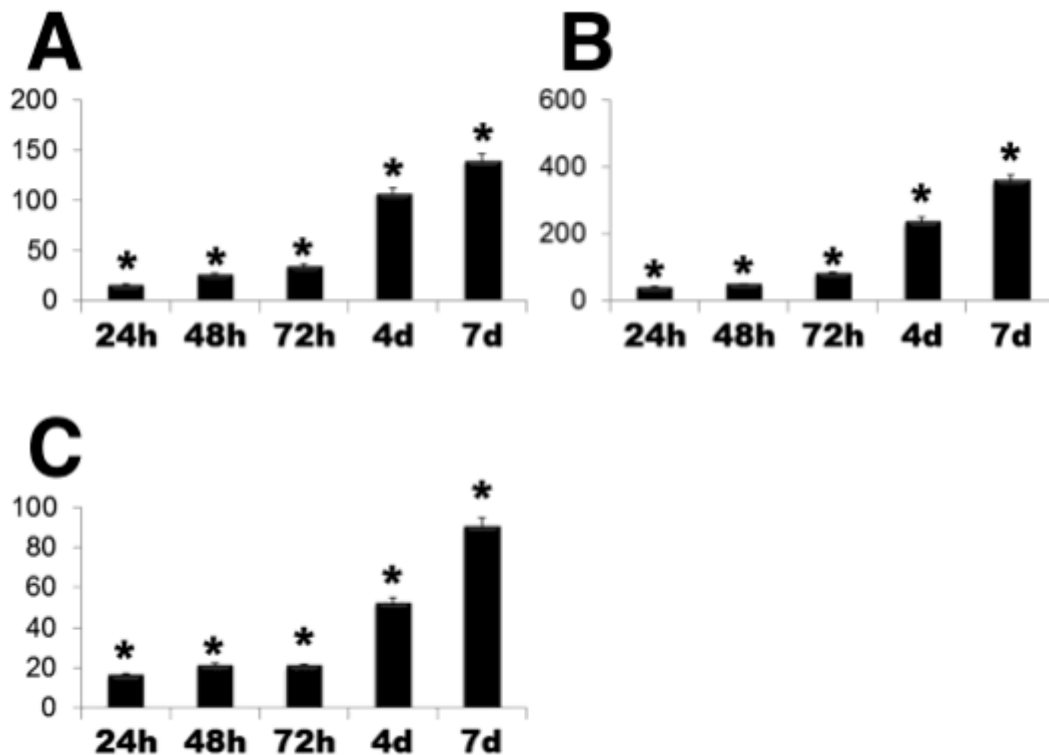
Le cellule sono state esposte in presenza o assenza del REAC per diversi tempi fino a 72 ore, o trattate per 72 ore e coltivate in assenza del REAC per ulteriori 4 o 7 giorni (rispettivamente giorno 7 o 10 dal time zero). L'espressione dei profili genici di Oct4 (A), Sox2 (B), cMyc(C), Nanog (D), e Klf4 (E) dell'mRNA di cellule trattate e non con il REAC è stata normalizzata con il GAPDH e graficata come fold change relative all'espressione di cellule di controllo non trattate definite come 1 (mean  $\pm$  S.E.; n=6).

Tutte le cellule trattate con il REAC sono significativamente differenti rispetto a quelle non trattate (Kruskal-Wallis and Wilcoxon Signed Rank test).



**Fig. 14** Effetto del REAC sulla vitalità, apoptosi e necrosi delle cellule HFF1.

Le cellule sono state seminate alla densità di  $2 \times 10^5$ /pozzetto, sono state trattate (istogramma grigio) e non (istogramma bianco) con il REAC. E' stato indicato il tempo di trattamento ed è stata stimata mediante conta cellulare la crescita (A), l'apoptosi (B), e la necrosi (C) (mean  $\pm$  S.E.; n=6).

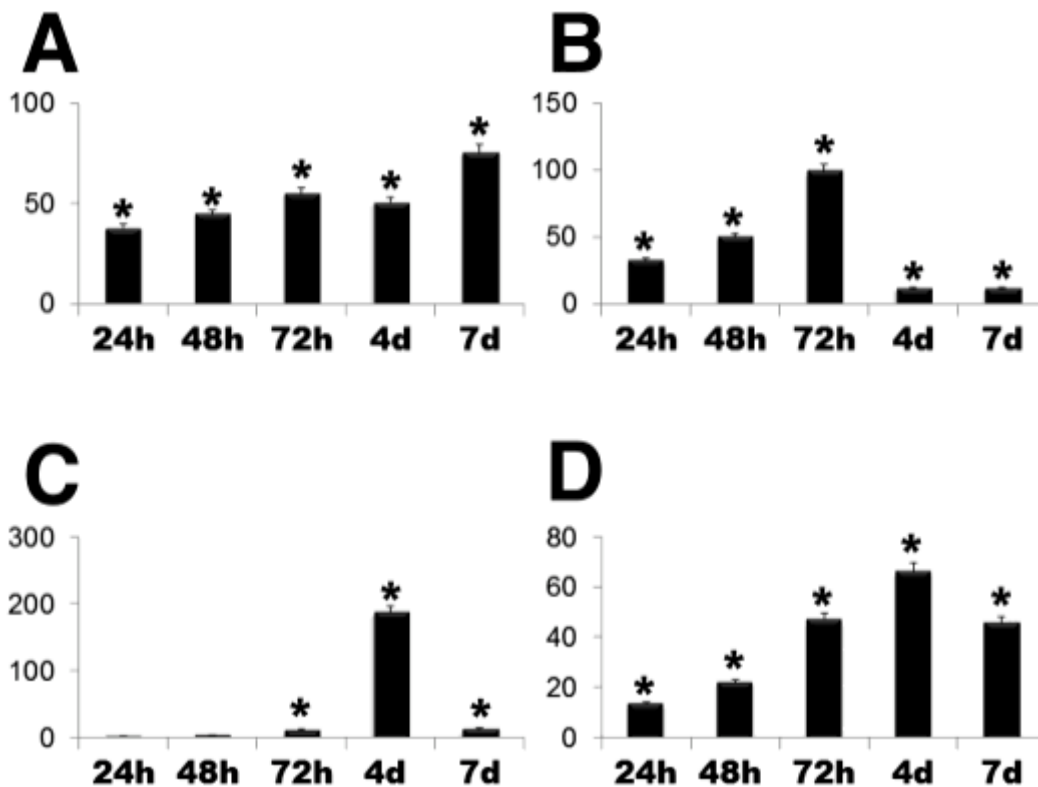


**Fig. 15** L'esposizione al REAC induce l'espressione dei geni implicati nella riprogrammazione cardiaca.

Le cellule sono esposte per 24, 48 or 72 ore in assenza o presenza dello stimolo REAC, o trattate per 72 ore e coltivate in assenza del REAC per ulteriori 4 o 7 giorni (rispettivamente giorno 7 o 10 dal time zero). L'espressione dei profili genici di Mef2c (A), Tbx5 (B), or GATA-4 (C)

dell'mRNA di cellule trattate e non con il REAC è stata normalizzata con il GAPDH e graficata come fold change relative all'espressione di cellule di controllo non trattate definite come 1 (mean  $\pm$  S.E.; n=6).

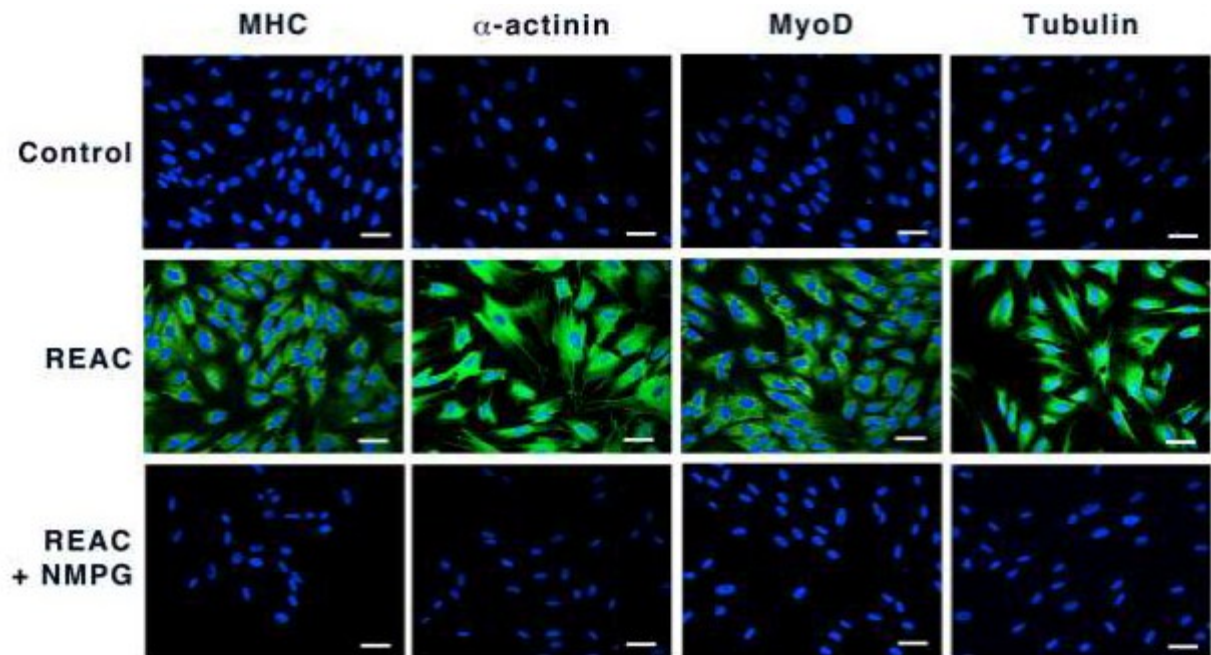
\*, significativamente differenti dalle cellule non trattate.



**Fig. 16.** Effetto della stimolazione REAC sull'espressione dei geni orchestratori del commitment di linee cardiogeniche, muscolari scheletriche e neuronali.

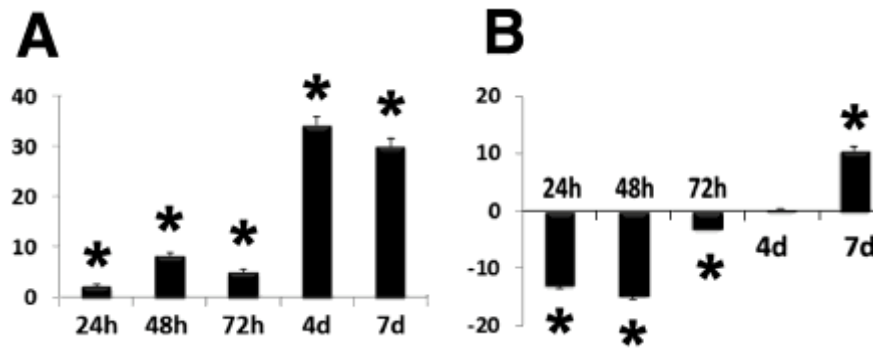
Le cellule sono state esposte per 24 – 48 – 72 ore in presenza o assenza del REAC, o trattate con REAC per 72 ore e coltivate (in assenza del trattamento) per ulteriori 4 o 7 giorni. L'espressione dell'mRNA della prodynorphin (A), Nkx2.5 (B), neurogenin1 (C) e MyoD (D) in cellule trattate e non con il REAC è stata normalizzata con il GAPDH e graficata per ciascun punto come come fold change relative all'espressione di cellule di controllo non trattate definite come 1 (mean ± S.E.; n=6).

Tutte le cellule trattate con il REAC sono significativamente differenti rispetto a quelle non trattate (Kruskal-Wallis and Wilcoxon Signed Rank test).



**Fig. 17.** Il REAC induce nei fibroblasti il commitment verso linee cardiogeniche, muscolari scheletriche e neuronali.

L'espressione dell' $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC),  $\alpha$ -sarcomeric actinin ( $\alpha$ -actinin), MyoD, e  $\beta$ -3-tubulin (tubulin) è stata osservata con l'ausilio della microscopia confocale nei fibroblasti coltivati per 72 ore in assenza/presenza dello stimolo REAC, e coltivate (successivamente) per ulteriori 4. In un esperimento separato, le cellule sono state preincubate per 2h prima del trattamento con il REAC con il free radical scavenger NMPG (100  $\mu$ M). La scala è di 40  $\mu$ m. I nuclei sono colorati con il DAPI (blu).



**Fig. 18** L'esposizione al REAC attiva selettivamente la trascrizione della subunità Nox4 della NADPH ossidasi.

Le cellule sono state esposte per 24 – 48 – 72 ore in presenza o assenza del REAC, o trattate con REAC per 72 ore e coltivate (in assenza del trattamento) per ulteriori 4 o 7 giorni. L'espressione dell'mRNA di Nox4 (A) e Nox1 (B) in cellule trattate e non con il REAC è stata normalizzata con il GAPDH e graficata per ciascun punto come come fold change relative all'espressione di cellule di controllo non trattate definite come 1 (mean  $\pm$  S.E.; n=6). \*, significativamente differenti dalle cellule non trattate.

## TABELLA DEI PRIMERS

GENI	Sequenze Oligonucleotidiche	Temperatura di anniling
<b>hProdinorfina</b>	<b>Forward TCATGGCCCATGCTATCCCC Reverse TGGCCAAGCTCTCTGGGTCA</b>	<b>57°C per 30s</b>
<b>mProdinorfina</b>	<b>Forward ATGAGGACCTGTACAAACGCTAT Reverse TCAGAATAGGTATTGGGGTTCTCC</b>	<b>59°C per 30s</b>
<b>mGATA4</b>	<b>Forward ATGTATCAGAGCTTG Reverse TTACGCAGTGATTAT</b>	<b>54°C per 30s</b>
<b>hGATA4</b>	<b>Forward TCCTCTGCCTGGTAATGACTC Reverse CTCAGATCCTTAGGTGCTAGA</b>	<b>54°C per 30s</b>
<b>m NKX2.5</b>	<b>Forward GGTCTCAATGCCTATGGCTACA Reverse AAGTTCACGAAGTTGCTGTTGG</b>	<b>59°C per 30s</b>
<b>h NKX2.5</b>	<b>Forward CCGCCGCCAACAACAACCTTC Reverse GCTGTTGAGGTGGGATCGGT</b>	<b>57°C per 30s</b>
<b>Oct4</b>	<b>Forward CTCACCCTGGGGGTTCTATT Reverse CTCCAGGTTGCCTCTCACTC</b>	<b>54°C per 30s</b>
<b>Sox2</b>	<b>Forward ACCTGCTAAGCTAGGCT Reverse GCTAACTTGGGCCATCGA</b>	<b>54°C per 30s</b>
<b>Nanog</b>	<b>Forward CATGAGTGTGGATCCAGCTTG Reverse CCTGAATAAGCAGATCCATGG</b>	<b>54°C per 30s</b>
<b>Neurogenina 1</b>	<b>Forward CCTACCGGCCATCGCCAT Reverse TTACATCGACTGCTGACT</b>	<b>54°C per 30s</b>
<b>MyoD</b>	<b>Forward ATCTCTGCTACTACCAT</b>	<b>54°C per 30s</b>

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico

	Reverse C TACTAACGTACGTCGT	
GENI	Sequenze Oligonucleotidiche	Temperatura di annealing
hTBX5	Forward CAGAGTCGGCACAGCGGCA Reverse GTGGGGAGCCATGGTTGGCC	55°C per 30s
hMEF2C	Forward GCCCTGAGTCTGAGGACAAG Reverse AGTGAGCTGACAGGGTTGCT	55°C per 30s
Nox1	Forward ATTGCCCAGGATCGAGGT Reverse GATGGAAGCAAAGGGAGTGA	57°C per 30s
hKlf4	Forward CCAATTACCCATCCTTCCTG Reverse CGATCGTCTTCCCCTCTTTG	54°C per 30s
Nox4	Forward GATCACAGAAGGTCCCTAGCAG Reverse GTTGAGGGCATTACCAAGT	57°C per 30s
hGAPDH	Forward GAGTCAACGGATTTGGTCGT Reverse GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	52-60°C per 30s
Smad1	Forward CCACCACCGTCTGCAAGATC Reverse CCTGGCTTGGCCATCTCTTT	59°C per 30s
Smad3	Forward CTGTGAGTTTGCCTTCAACA Reverse CAGCTCGTAGTAGGAGATGG	54°C per 30s
Smad4	Forward GAAGGACTGTTGCAGATAGC Reverse AACTGCACTCCTTTCCTAT	54°C per 30s
Smad7	Forward TCCCCCTCCTGCTGTGCAAA Reverse ACAGCCGATCTTGCTCCGCA	59°C per 30s

**Sara Santaniello** Studio dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e la plasticità di cellule staminali: identificazione di nuove strategie molecolari di riprogrammazione di cellule umane adulte a scopo terapeutico