

Riassunto Tesi dal titolo:

Produzione di progenitori telencefalici ventrali e neuroni striatali tramite sovra-espressione inducibile di fattori di trascrizione in cellule staminali embrionali umane.

di Angela Laporta

Le cellule staminali possiedono due caratteristiche distintive fondamentali: autorinnovamento e potenziale differenziativo.

Quello che rende le linee cellulari di staminali embrionali umane (hES) estremamente interessanti per la ricerca è la loro capacità di generare tutte le cellule di un organismo, comprese le staminali tissutali multipotenti, specializzate nella produzione di cellule specifiche per il tessuto o per il sistema di cui fanno parte.

In questa tesi abbiamo utilizzato le cellule hES per derivare cellule neuroepiteliali di tipo telencefalico ventrale. Queste cellule sono state poi differenziate con successo in neuroni striatali.

Per realizzare questo obiettivo ci siamo basati sulle conoscenze di neurobiologia dello sviluppo a nostra disposizione. La neurogenesi nel mammifero ha inizio con l'induzione del neuroectoderma, che forma la placca neurale, la quale si ripiega formando il tubo neurale. Queste strutture sono costituite da cellule chiamate progenitori neuroepiteliali (NEPs).

Progressi nel campo delle colture cellulari hanno permesso di studiare questo processo di neuralizzazione, inducendolo in cellule staminali embrionali in vitro. Durante il differenziamento neurale, le cellule hES vanno incontro ad una progressiva restrizione del loro destino, analogamente a quanto avviene in vivo, portando alla generazione di diverse popolazioni di precursori neurali.

Il protocollo di differenziamento usato in questa tesi è basato su una doppia inibizione della via di SMAD (*dual-SMAD inhibition protocol*), grazie alla somministrazione di un inibitore di BMP e di una molecola sintetica, capace di inibire la via di trasduzione del segnale di TGF β . Queste cellule esprimono marcatori specifici per le "rosette", strutture cellulari che rappresentano la controparte in vitro del tubo neurale. Abbiamo focalizzato l'attenzione sulla formazione del corpo striato che prende origine dalle eminenze ganglioniche laterale (LGE), ed in particolare sulla sua parte ventrale (vLGE), che dà origine ai neuroni striatali (MSN, *medium-sized spiny neurons*).

Per il differenziamento verso un fenotipo striatale sono state adottate due strategie.

Una strategia è basata sul *dual-SMAD inhibition protocol* e prevede la somministrazione di morfogeni (Shh e Dkk-1), con lo scopo di fornire le coordinate posizionali corrette alle cellule hES durante il loro differenziamento in senso neurale.

Una seconda strategia è basata sulla sovra-espressione inducibile di fattori di trascrizione importanti per lo sviluppo dello striato.

In particolare, in questa tesi verranno mostrati i risultati ottenuti con le linee di cellule hES inducibili per Gsx2 e per Ctip2-Ebf1: in quest'ultimo caso i fattori sono co-espressi tramite una sequenza IRES. Lo studio di queste linee ha mostrato come la sovra-espressione inducibile rappresenta uno strumento utilissimo per conferire alle cellule hES un carattere neuroepiteliale prima, e striatale poi.

L'espressione a mosaico dei fattori trascrizionali nelle nostre linee stabili inducibili ha permesso da un lato un'analisi più dettagliata del ruolo dei fattori di trascrizione studiati, dall'altro ha evidenziato il bisogno di sviluppare sistemi di sovra-espressione più efficienti per migliorare il processo differenziativo in termini di percentuali di cellule ottenute con fenotipo striatale al termine del differenziamento.