



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Cellulare

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

*Ruolo del fattore di trascrizione Prep1 nella regolazione delle
Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs)*

Candidato

Raffaele Luongo

Relatore

Dott.ssa Maria Cristina Magli

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE.....	5
1. LE CELLULE STAMINALI.....	5
1.1 Cellule Staminali Embrionali (ESCs)	8
1.1.1 Meccanismi molecolari nelle ESCs	8
1.1.2 Murine Embryonic Stem Cells (mESCs).....	11
1.1.3 Human Embryonic Stem Cells (hESCs).....	16
1.2 Cellule Staminali Pluripotenti indotte (iPSCs)	19
1.3 Cellule Staminali Adulte, ASCs	26
1.3.1 La nicchia	32
1.3.2 Plasticità delle ASCs.....	40
2. LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	43
2.1 Attività Trofica.....	53
2.2 Meccanismi molecolari di differenziazione.....	60
2.2.1 Adipogenesi.....	61
2.2.2 Osteogenesi.....	72
2.2.3. MSCs: uno switch controlla il destino differenziativo.....	77
3. GLI OMEOGENI.....	86
3.1 I geni <i>Hox</i>	88
3.2 I TALE	91
4. <i>PREP1</i>	95
SCOPO DELLA TESI	109

MATERIALI E METODI.....	111
1. BIOLOGIA CELLULARE.....	111
1.1 Animali	111
1.2 Isolamento ed espansione di mMSCs	111
1.3 Coltura della linea cellulare MC3T3-E1	112
1.4 Coltura di HEK 293T.....	113
1.5 Congelamento e scongelamento delle cellule.....	113
1.6 Differenziazione Adipogenica di mMSCs.....	114
1.7 Differenziazione Osteogenica di mMSCs.....	114
1.8 Differenziazione Osteogenica di MC3T3-E1	115
1.9 Colorazioni citochimiche.....	115
1.9.1 Colorazione citochimica con Oil Red O.....	115
1.9.2 Colorazione citochimica mediante Alizarin Red S.....	116
2. BIOLOGIA MOLECOLARE.....	117
2.1 Estrazione dell'RNA totale di mMSCs e delle MC3T3-E1.....	117
2.2 Retrotrascrizione dell'RNA	118
2.3 Real-Time qPCR.....	118
2.4 Estrazione Proteica dalle mMSCs.....	120
2.5 Western Blot	120
2.6 Infezione lentivirale di mMSCs ed MC3T3-E1.....	122
2.6.1 Amplificazione dei costrutti	124
2.6.2 Estrazione DNA plasmidico.....	124
2.6.3 Packaging dei vettori virali	125
2.6.4 Infezione di mMSCs e MC3T3-E1	126
2.7 ChIP-Seq (<i>Chromatin ImmunoPrecipitation-Sequencing</i>).....	127

RISULTATI.....	130
1. Espressione di <i>Prep1</i> in mMSCs indifferenziate.....	130
2. Differenziazioni <i>in vitro</i> di mMSCs	131
3. Espressione di <i>Prep1</i> in mMSCs wild type differenziate	134
3.1 Analisi dell'espressione di <i>Prep1</i> in mMSCs wt durante la differenziazione adipogenica <i>in vitro</i>	134
3.2 Analisi dell'espressione di <i>Prep1</i> in mMSCs wt durante la differenziazione osteogenica <i>in vitro</i>	136
4. Espressione proteica di Prep1 in hMSCs.....	137
5. Effetti della down-regolazione di <i>Prep1 in vivo</i>	139
5.1 Differenziazione adipogenica di mMSCs <i>Prep1^{i/i}</i>	141
5.2 Confronto dell'espressione di Prep1 in mMSCs wt e <i>Prep1^{i/i}</i>	143
6. Espressione di Pbx1 in mMSCs.....	145
7. Infezione di mMSCs e MC3T3-E1	147
8. ChIP Seq su mMSCs.....	149
DISCUSSIONE	151
CONCLUSIONI	158
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	159