



Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare
Scuola di Dottorato di ricerca in Biomedicina
CICLO XXVI

TESI DOTTORATO

Derivazione e caratterizzazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) per la produzione di megacariociti

Direttore della scuola: Prof. Riccardo Manganelli

Dipartimento di Medicina Molecolare

Supervisore: Prof.ssa Luisa Barzon

Dipartimento di Medicina Molecolare

Dottoranda: Dott.ssa Giulia Costanzi

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1 LE CELLULE STAMINALI	8
1.1 LE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI	10
1.2 METODI PER GENERARE CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI	13
1.2.1 Trasferimento nucleare	14
1.2.2 Fusione cellulare	16
1.2.3 Riprogrammazione diretta mediante aggiunta di fattori di trascrizione	18
2 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (iPS)	19
2.1.1 Fattori di riprogrammazione	20
2.1.2 Vettori virali	22
2.1.3 Vettori non virali	26
2.2 APPLICAZIONI DELLE iPSCs E PROSPETTIVE FUTURE	32
SCOPO DELLO STUDIO	38
MATERIALI E METODI	38
3 LINEE CELLULARI	39
3.1 ESPANSIONE DELLE LINEE CELLULARI	41
4 VETTORI RETROVIRALI	42
4.1 PRODUZIONE DEI VETTORI RETROVIRALI	42
4.1.1 Caratteristiche dei vettori retrovirali.....	42
4.1.2 Amplificazione del DNA plasmidico	43
4.1.3 Trasfezione di HEK293T e Plat-A con i vettori retrovirali	43
4.1.4 Saggio d'infettività dei fibroblasti.....	44
4.1.5 Produzione vettori retrovirali su larga scala	45
4.2 RIPROGRAMMAZIONE MEDIANTE VETTORI RETROVIRALI.....	46

5	VETTORI DERIVATI DAL SENDAI VIRUS.....	46
5.1	VETTORI VIRALI DERIVATI DAL VIRUS DEL SENDAI.....	46
5.2	RIPROGRAMMAZIONE MEDIANTE VIRUS DEL SENDAI	47
6	VETTORI EPISOMALI	48
6.1	PRODUZIONE VETTORI EPISOMALI	48
6.1.1	Amplificazione DNA plasmidico	48
6.2	RIPROGRAMMAZIONE MEDIANTE VETTORI EPISOMALI.....	49
7	VETTORI ADENOVIRALI.....	50
7.1	PRODUZIONE DEI VETTORI ADENOVIRALI.....	50
7.1.1	Plasmidi per la produzione dei vettori adenovirali	50
7.1.2	Costruzione vettori adenovirali contenenti geni umani	50
7.1.3	Amplificazione e analisi di restrizione del DNA plasmidico	51
7.1.4	Linearizzazione dei plasmidi adenovirali.....	51
7.1.5	Transfezione del genoma adenovirale ricombinante in cellule di packaging.....	52
7.1.6	Amplificazione dell'adenovirus ricombinante	53
7.1.7	Titolazione dell'adenovirus ricombinante mediante metodo Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID50)	53
7.1.8	Saggio d'infettività su HFF e BNL	54
7.1.9	Immunofluorescenza (IF)	55
7.2	MESSA A PUNTO PROTOCOLLO DI RIPROGRAMMAZIONE CON ADENOVIRUS RICOMBINANTI	57
8	CARATTERIZZAZIONE CLONI iPSCs	58
8.1	TEST DELLA FOSFATASI ALCALINA.....	58
8.2	IMMUNOFLUORESCENZA PER I MARCATORI DELLA PLURIPOTENZA	58
8.3	ANALISI MARCATORI DELLA PLURIPOTENZA MEDIANTE RT-PCR	61
8.3.1	Estrazione dell'RNA totale	61
8.3.2	Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)	61
8.4	FORMAZIONE DI EMBRYOID BODIES.....	62
8.4.1	RT-PCR e PCR.....	63
9	DIFFERENZIAMENTO DELLE iPSCs IN MEGACARIOCITI.....	64

RISULTATI	65
10 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI RETROVIRALI	65
10.1 CONFRONTO TRA SISTEMI DI PACKAGING: HEH293T E PLAT-A	65
10.2 CONFRONTO TRA SISTEMI DI TRASDUZIONE: TRASDUZIONE STATICA E SPIN-INOCULATION	66
10.3 SAGGIO DI INFETTIVITÀ DEI FIBROBLASTI UMANI.....	68
11 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI DERIVATI DAL VIRUS DEL SENDAI ..	71
12 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI EPISOMALI	73
13 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI ADENOVIRALI	76
13.1 PRODUZIONE DI VETTORI ADENOVIRALI PER LA GENERAZIONE DI iPSC76	
13.2 IMMUNOFLOURESCENZA	77
13.3 MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO DI RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI ADENOVIRALI.....	80
14 CARATTERIZZAZIONE CLONI iPSC	81
14.1 TEST DELLA FOSFATASI ALCALINA	81
14.2 IMMUNOFLOURESCENZA SUI MARCATORI DI PLURIPOTENZA.....	83
14.3 ESPRESSIONE DEI TRASCritti DEI MARCATORI DEI GENI DELLA PLURIPOTENZA	85
14.4 TEST DEGLI EMBRYOID BODIES.....	86
15 DIFFERENZIAMENTO IPSCS IN MEGACARIOCITI	88
DISCUSSIONE	90
BIBLIOGRAFIA	94
RINGRAZIAMENTI	114

RIASSUNTO

Introduzione: Il termine trombocitopenia, o piastrinopenia, indica la carenza di piastrine nel sangue. Le possibilità terapeutiche per le forme ereditarie sono molto limitate in particolare sono disponibili trasfusioni di piastrine che correggono il difetto solo per pochi giorni e possono indurre la formazione di anticorpi che riducono l'efficacia delle infusioni successive. Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) sono in grado di produrre cellule appartenenti a tutti e tre i foglietti germinativi e possono rappresentare un sistema efficiente per produrre piastrine autologhe paziente-specifiche.

Scopo dello studio: L'obiettivo di questo studio è stato la riprogrammazione di cellule somatiche umane a cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), per il trattamento di patologie piastriniche. A questo scopo le iPSCs sono state riprogrammate avvalendosi sia di protocolli integranti che non-integranti e differenziate lungo in lineage ematopoietico allo scopo di ottenere megacariociti in grado di produrre piastrine.

Materiali e metodi: Le cellule iPS sono state derivate mediante tre differenti metodi di riprogrammazione tra cui i vettori retrovirali (RV), derivati dal virus del Sendai (SeV) ed episomali (EpV). Tutti i vettori esprimevano i quattro fattori di trascrizione Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc. Successivamente i cloni iPSCs sono stati completamente caratterizzati e differenziati in megacariociti mediante differenziamento diretto.

Risultati: In questo studio sono stati derivati più di 30 cloni iPSCs mediante trasduzione di vettori RV e SeV e trasfezione con vettori EpV. Il protocollo di riprogrammazione basato sui vettori adenovirali (AdV) si è rivelato inefficiente. I megacariociti derivati dalle cellule iPS risultavano polinucleati, con estroflessioni sulla superficie simili alle pro-piastrine e in grado di rilasciare cellule anucleate.

Conclusioni: In conclusione sono stati derivati con successo cloni di iPSC con vettori virali integranti retrovirali, con vettori virali non integranti derivati dal virus del Sendai e con vettori non virali, non integranti, quali i vettori episomali.

Tutti i cloni ottenuti esprimevano tutti i marcatori di pluripotenza e una volta formati i corpi embrionali (EBs), tutti esprimevano anche i marcatori dei tre i foglietti germinativi. Inoltre è stato sviluppato un nuovo protocollo di differenziamento diretto da iPSCs a megacariociti in grado di creare una terapia su misura per pazienti con disordini piastrinici.

ABSTRACT

Introduction: Thrombocytopenia consists in a lack of blood platelets. Hereditary forms have limited therapeutic possibilities, such as platelets transfusions that only temporarily restore the defect and can lead to the formation of anti-platelet antibodies, reducing thus the effectiveness of subsequent infusions. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) hold the great potential to be differentiated into the cells of all the three germ layers, being moreover patient-specific and representing a great tool for the production of autologous platelets.

Aim: aim of this study was to reprogram human somatic cells to iPSCs, for the treatment of platelet's disorders. For this purpose iPSCs were derived from fibroblasts by both integrating and non-integrating methods and were differentiated along the hematopoietic lineage to give rise to platelets producing megakaryocytes.

Materials and Methods: iPS cells were derived by three different reprogramming protocols including retroviral vectors (RV), Sendai virus vectors (SeV) and episomal vectors (EpV), all expressing the four transcription factors, OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc. iPSC clones were then fully characterized and differentiated into megakaryocytes by direct differentiation.

Results: In this study more than thirty iPSCs clones were derived by RV and SeV transduction and EpV transfection. Six iPSCs clones were fully characterized. The reprogramming protocol based on adenoviral vectors (AdV) resulted inefficient. iPSCs-derived megakaryocytes appeared as multinucleated cells, with protrusions on the surface similar to the pro-platelets and able to release anucleate cells.

Conclusions: iPS clones were successfully derived by integrating and non-integrating viral vectors, and non-integrating vectors. All characterized clones expressed all the markers of pluripotency as well as the markers of the three germ layers upon embryoid bodies (EBs) formation. A new protocol for direct differentiation of iPSCs into megakaryocytes was developed, holding a great

potential for patient-specific treatment by a tailored-therapy for platelet disorders.

INTRODUZIONE

Il termine trombocitopenia, o piastrinopenia, indica la carenza di piastrine nel sangue. Interessa circa il 4% della popolazione e il più delle volte viene scoperta casualmente. Quando il numero delle piastrine è compreso tra 100 e 150 miliardi per litro di sangue non si corre alcun rischio, ma quando il valore scende a valori tra 50 e 100 si può andare incontro a emorragie in occasione di traumi come parto, interventi dentistici o chirurgici. Al di sotto di 50 per litro, possono verificarsi emorragie spontanee a livello della cute o delle mucose, quali lividi, sanguinamento dal naso e dalle gengive. Nei casi più gravi le emorragie interessano il cervello o l'intestino e possono essere fatali. Nella maggior parte dei casi la trombocitopenia è acquisita e può dipendere dalla formazione di autoanticorpi o dallo sviluppo di altre malattie; più raramente è ereditaria e quindi presente sin dalla nascita. La distinzione tra piastrinopenie ereditarie e acquisite può essere difficile e i pazienti con forme genetiche non riconosciute sono a rischio di terapie inutili o addirittura dannose. È quindi essenziale cercare di capire se il deficit di piastrine o la facilità al sanguinamento sono presenti sin dalla più tenera età ed eventualmente anche in altri membri della famiglia.

Le piastrinopenie ereditarie variano nella loro manifestazione in base alle caratteristiche ed eziologie e molecolari. Possono essere classificate in base alla dimensione piastrinica o in base alla presenza di altre anomalie associate.

Se per le trombocitopenie acquisite sono disponibili numerosi trattamenti in grado di aumentare o normalizzare il numero delle piastrine, più limitate sono le possibilità terapeutiche per le forme ereditarie. Le trasfusioni di piastrine correggono il difetto solo per pochi giorni e possono indurre la formazione di anticorpi che riducono l'efficacia delle infusioni successive; so quindi indicate solo in presenza di sanguinamenti gravi o prima di interventi chirurgici. Nelle poche forme ereditarie che espongono il paziente al rischio di morte è indicato il trapianto di midollo, soprattutto in presenza di un donatore compatibile. Grazie all'avvento della tecnologia delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) è possibile prospettare che in un futuro, non troppo lontano, sia possibile produrre

piastrine autologhe o correggere i difetti genetici alla base delle trombocitopenie ereditarie.

- **Megacariociti e piastrine**

Le piastrine svolgono un ruolo fondamentale nello stimolare la formazione di coaguli per la riparazione delle lesioni vascolari. Tuttavia, a causa della loro breve vita di soli 7-10 giorni, le piastrine devono costantemente essere sostituite per mantenerne i livelli normali ($150-400 \times 10^3/\mu\text{l}$) nel sangue. Il pericolo di incorrere in trombocitopenia (bassa conta piastrinica) può verificarsi in pazienti per una varietà di ragioni, tra cui la chemioterapia, la radioterapia, od a causa di interventi chirurgici o trapianti. Per aggirare i rischi connessi a queste condizioni, le trasfusioni di piastrine sono diventate la terapia cardine, ma l'alta richiesta e la limitata durata delle piastrine, hanno portato ad una carenza costante di materiale per le trasfusioni (Reems J. A. et al, 2010). La capacità di generare piastrine con un HLA specifico *in vitro*, fornirebbe vantaggi significativi rispetto ai programmi di donazione per le trasfusioni. La produzione di piastrine in vivo è un processo altamente efficiente in cui vengono prodotte 2000-10000 piastrine da ciascun megacariocita (MK), che rappresenta la cellula precursore (Kaufman R. M. et al, 1965; Long M. W., 1998). Per facilitare la maturazione dei MK e la produzione di piastrine, vengono utilizzate la trombopoietina (TPO) che è una citochina essenziale per la trombopoiesi e altre citochine presenti nel midollo osseo (BM) come l'interleuchina (IL) -3, IL- 6, IL- 9, IL- 11, la proteina morfogenetica dell'osso (BMP)-4, il ligando di Flt3 (FL), e il fattore delle cellule staminali (SCF) (Kaushansky K., 2008), mentre i fattori di trascrizione, come GATA-1 e FOG-1, aiutano a dirigere la maturazione e la frammentazione dei megacariociti in piastrine (Wang X. Et al, 2002; Gaines P. et al, 2000) (Fig. 1).

Durante la maturazione i grandi megacariociti divengono poliploidi, che raggiungono le dimensioni di circa 50-100 micron di diametro, e contengono fino a 64 genomi di DNA ed a questo punto viene innescata la trombopoiesi, cioè il rilascio di piastrine nel sangue (Kosaki G., 2005; Patel S. R. et al, 2005). Sono state prodotte, *in vitro* con successo, piastrine funzionanti a partire da cellule

ematopoietiche CD34+ di midollo osseo, dal sangue del cordone ombelicale e da sangue periferico (PB) (Guerriero R. et al, 2001; Matsunaga T. et al, 2006). Le cellule staminali embrionali umane (hESC) possono essere propagate *in vitro* per un tempo indeterminato, fornendo una fonte potenzialmente illimitata di cellule per uno scopo terapeutico. Sebbene due studi (Gaur M. et al, 2006; Takayama N. et al, 2008) hanno fornito una prova che era possibile la produzione *in vitro* di megacariociti derivati dalle hESC, solo uno di questi e uno più recente (Takayama N. et al, 2008; Ono Y. et al, 2012) hanno esteso lo studio alla comprensione del meccanismo di produzione delle piastrine. Nonostante questo lavoro pionieristico, si è notata una bassa resa e una limitata funzionalità *in vitro* delle piastrine derivate. Tuttavia, utilizzando emangioblasti (BCS) come intermedi, è stato dimostrato un metodo efficace per generare MKs funzionali su larga scala a partire da hESCs (Lu S. J. Et al, 2007; Lu S. J. Et al, 2008; Lu S. J. Et al, 2011). Le piastrine prodotte da MKs derivate dalle hESC, hanno dimostrato avere tutte le caratteristiche ultrastrutturali e i criteri morfologici tipici delle piastrine, possedendo anche le proprietà caratteristiche delle piastrine funzionali, come l'attivazione da trombina, la diffusione sul fibrinogeno e la formazione/retrazione dei coaguli di fibrina. È importante sottolineare che analisi di microscopia a fluorescenza intravitale hanno dimostrato che le piastrine derivate dalle hESC sono state incorporate nello sviluppo di trombi piastrinici nei siti dove era stata creata con un laser una lesione nella parete arteriolare di topo, con modalità e intensità molto simili a quelle delle piastrine normali del sangue umano si sono ricreati i trombi sopra citati. Questi risultati forniscono la prova che le piastrine derivate dalle hESC potrebbero essere utili per le trasfusioni di piastrine.

Le cellule staminali pluripotenti umane sono facilmente accessibili per la manipolazione genetica specifica e controllata e possono essere uno strumento promettente per lo studio della regolazione trascrizionale durante lo sviluppo dei MK umani o dei segnali cellulari che promuovono il rilascio delle piastrine, che sono anucleate e quindi non suscettibili alla manipolazione genetica diretta. Inoltre, le cellule staminali pluripotenti indotte paziente-specifiche (iPSCs) permettono di studiare la patogenesi della malattia o svolgere saggi *in vitro* per

lo screening di farmaci o test sulla differenziazione delle cellule, senza la necessità di soggetti umani.

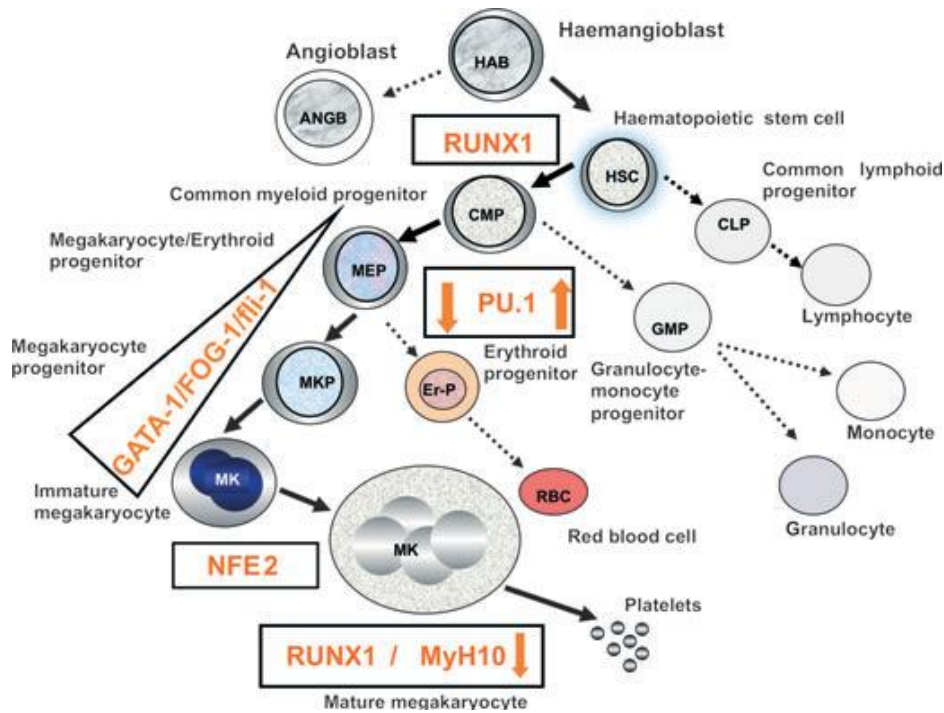


Figura 1. La figura rappresenta i maggiori fattori di trascrizione coinvolti durante lo sviluppo dei megacariociti (MKS) partendo dagli emangioblasti (HAB), che dà origine a due cellule staminali, vascolari e ematopoietiche (HSC). Il megacariocita progenitore (MKP) è derivato dal progenitore MK-eritroide comune (MEP). Ogni fase dello sviluppo MK richiede la trascrizione di specifici fattori indicati nelle caselle (Deutsch V.R. et al., 2013).

1 LE CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali si definiscono come precursori cellulari immaturi dotati della capacità di auto-rinnovamento (self-renewal) e della grande potenzialità di differenziazione multilineare. Esse rappresentano l'unità fondamentale del nostro corpo, conducono la generazione embrionale durante lo sviluppo e permettono la rigenerazione dei tessuti adulti a seguito di danneggiamenti degli stessi (Weissman I. L., 2000; Hanna J.H. et al, 2010). Attraverso una divisione cellulare asimmetrica, la cellula staminale dà origine a due cellule figlie: una

identica a se stessa, scarsamente proliferante che è in grado di mantenere invariato il pool di cellule staminali di quel tessuto; l'altra con capacità proliferativa e di maturazione progressiva verso cellule fenotipicamente e funzionalmente sempre più specializzate. Con questa divisione asimmetrica viene mantenuto inalterato il numero di cellule staminali, mentre le cellule maggiormente commissionate, dividendosi ulteriormente, danno origine ad un numero rilevante di cellule mature che compongono i tessuti (Cai J. et al, 2004).

Le cellule staminali possono essere suddivise in base alla loro origine, ossia in embrionali (che derivano dalla massa cellulare interna dell'embrione allo stato di blastocisti), fetali (presenti nel feto), amniotiche (ricavate dal liquido amniotico, sono simili a quelle embrionali) ed adulte, che si trovano all'interno di tessuti specifici composti di cellule specializzate.

In base alle loro potenzialità differenziative, le cellule staminali sono classicamente suddivise in:

- ❖ **Cellule Staminali Totipotenti:** cellule staminali in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale. Queste cellule derivano da embrioni allo stadio di 4-8 cellule, dopo 1-3 giorni dalla fecondazione;
- ❖ **Cellule Staminali Pluripotenti:** cellule embrionali allo stadio di blastocisti, dopo 4-14 giorni dalla fecondazione. Queste cellule sono capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre diversi foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma ed endoderma);
- ❖ **Staminali Germinali:** sono cellule staminali pluripotenti (cellule riproduttive progenitrici). Nell'embrione post-impianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se difficile è il loro isolamento. Queste cellule rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi e compaiono nell'embrione di topo ed umano, alla 1° e 3° settimana di sviluppo, rispettivamente. Se isolate, queste cellule sono in grado, come le cellule staminali embrionali, di replicarsi illimitatamente in vitro mantenendo capacità differenziative pluripotenti.

- ❖ **Cellule Staminali Multipotenti:** sono cellule che hanno la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in coltura, ma non quella di rinnovarsi in modo illimitato. Differenziano in tessuti diversi ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale. Appartengono a tale categoria le cellule staminali adulte.
- ❖ **Cellule Staminali Unipotenti:** presenti nei tessuti adulti, potenzialmente più limitate nonché organo-specifiche, sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento.

La multipotenzialità dei compartimenti rigenerativi intratissutali viene conservata nell'individuo adulto dalle cellule staminali adulte con un potenziale di staminalità che assicura il rinnovamento dei vari tessuti specializzati.

Le controversie etiche che riguardano l'isolamento delle hESC e il bisogno di una sorgente di cellule staminali pluripotenti hanno portato ad approfondite ricerche nel campo della riprogrammazione cellulare adulte fino alla generazione, nel 2006, delle prime cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) (Takahashi K. et al, 2006).

1.1 LE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali embrionali derivano dalla regione interna dell'embrione ("*inner cell mass*") allo stato di blastocisti e hanno una potenzialità di auto-replicarsi in modo illimitato pur mantenendo il proprio stato di totipotenza (Fig. 2). La caratteristica più interessante delle cellule ES, per i possibili sviluppi terapeutici, è la loro capacità di differenziarsi, in specifiche condizioni di coltura, in quasi tutti i tipi cellulari dell'organismo. Cellule ES di topo sono state differenziate in vitro in cellule epiteliali, muscolari, nervose, epatiche, pancreatiche ed in osteoblasti ed adipociti (Wobus A.M., 2001) Le cellule staminali embrionali (ES) umane, isolate per la prima volta da James Thomson nel 1998 (Thomson J. A. et al, 1998), rappresentano una promettente fonte di

cellule allogeniche per la medicina rigenerativa. La principale applicazione potenziale della tecnologia delle cellule staminali ES umane è rivolta allo studio dello sviluppo embrionale ed a quello della scoperta di nuovi farmaci. In particolare, in farmacologia, l'abilità a far crescere popolazioni pure di specifici tipi cellulari offre un ottimo strumento per saggiare l'efficacia di nuove molecole nel trattamento di diverse patologie. Tuttavia queste cellule mostrano importanti limitazioni e hanno sollevato diverse controversie bioetiche e politiche sia riguardo al metodo con cui vengono derivate, in quanto è necessario sopprimere un embrione di 14 giorni per ottenerle, sia per quanto riguarda la sicurezza nell'uso delle hESC nella terapia cellulare. Infatti, le hESC, se differenziate nel tipo cellulare necessario ed iniettate nel paziente, genererebbero una reazione di rigetto perché allogeniche ed il paziente dovrebbe essere sottoposto a terapia immunosoppressiva per tutto il resto della vita.

Per tutte queste motivazioni gli scienziati hanno studiato nuove strategie di ottenimento di cellule staminali pluripotenti utilizzabili in pratica clinica e come modello di studi di malattia.

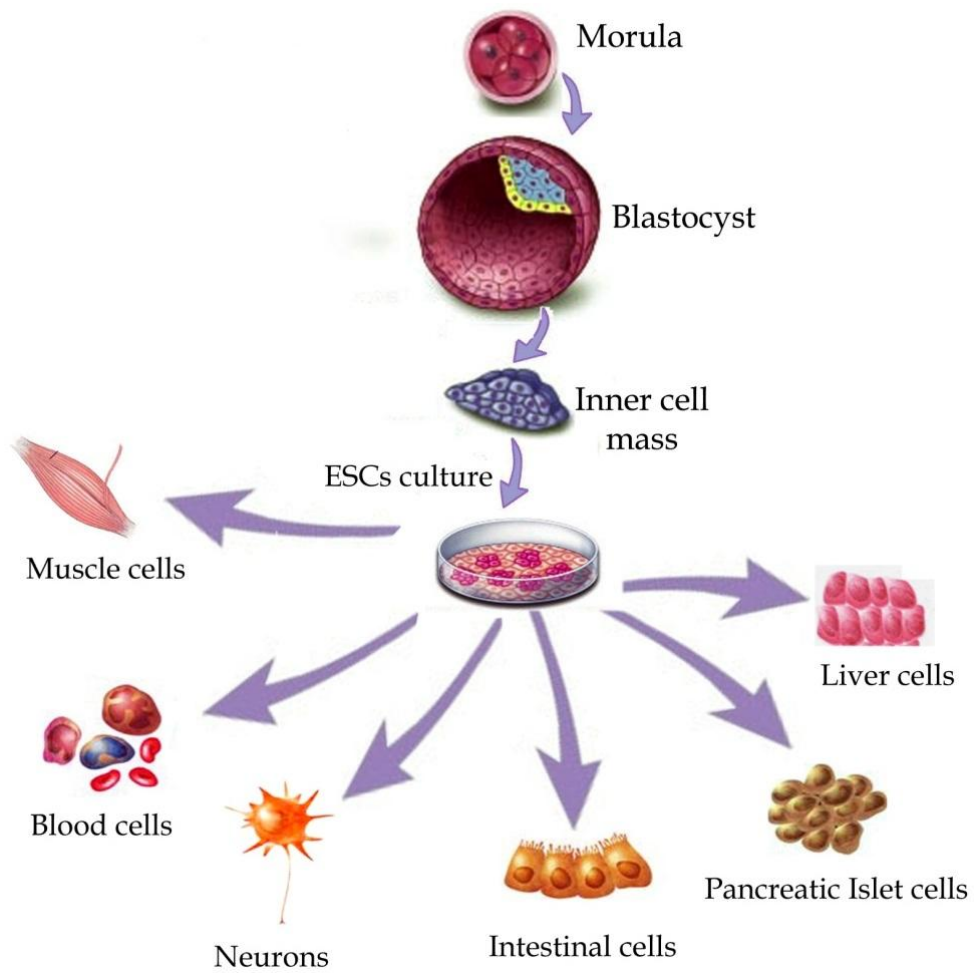


Figura 2. Derivazione delle cellule staminali embrionali. Dallo stadio di blastocisti viene prelevata la massa cellulare interna (IMC) e le cellule messe in coltura in particolari condizioni. Successivamente le ESC possono essere differenziate in tutti i tipi cellulari perché pluripotenti (Meragalli M et al. 2011).

1.2 METODI PER GENERARE CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI

Le principali strategie di riprogrammazione fino ad oggi utilizzate sono: il trasferimento nucleare, la fusione cellulare, la riprogrammazione mediante estratti cellulari e la riprogrammazione diretta tramite l'espressione forzata di un *cocktail* di fattori di trascrizione (Fig. 3). Con questi metodi, i nuclei di cellule somatiche adulte sono indotti ad esprimere geni caratteristici delle cellule staminali embrionali e divengono così cellule staminali pluripotenti.

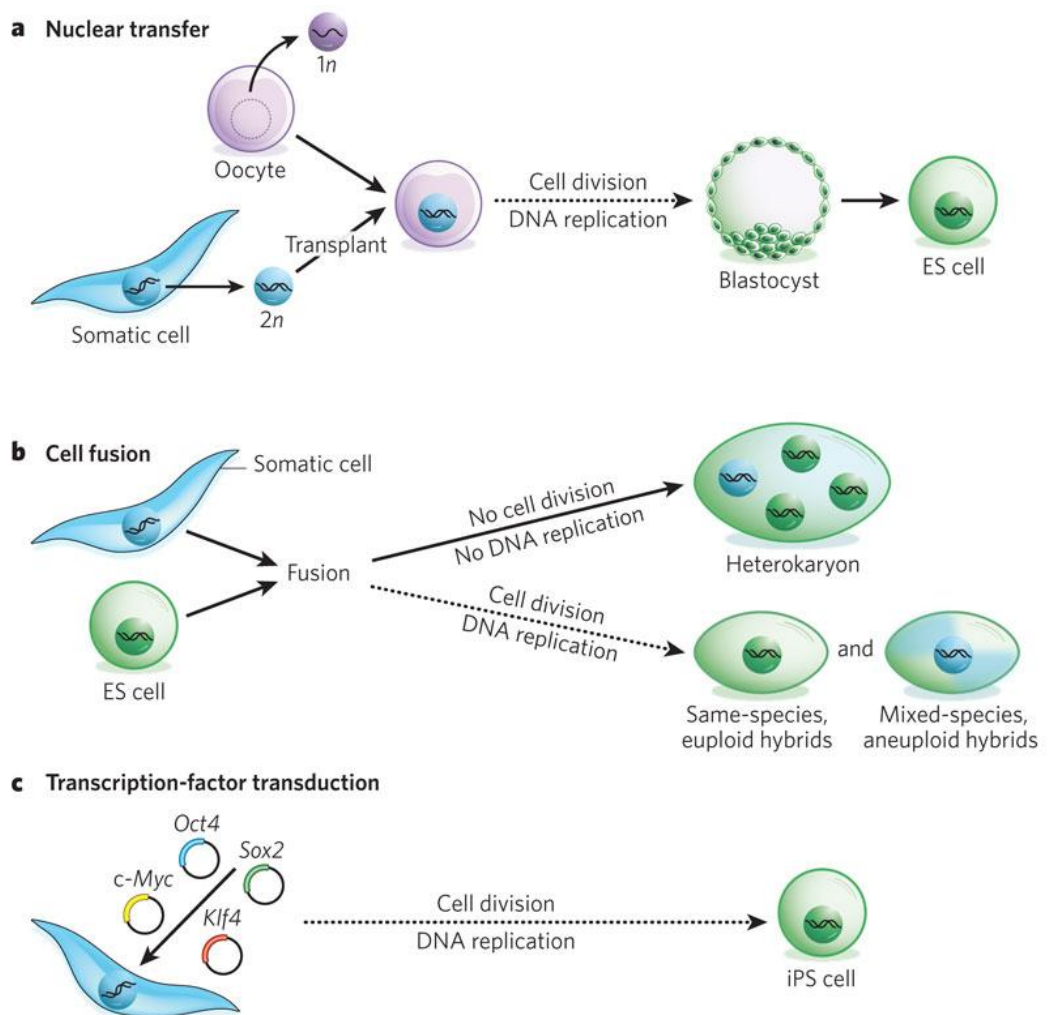


Figura 3. La figura mostra i tre principali metodi di riprogrammazione delle cellule somatiche a cellule staminali. A) Trasferimento nucleare, B) Fusione cellulare e C) Riprogrammazione diretta mediante trasduzione di fattori di trascrizione (Yamanakas. et al., 2010).

1.2.1 Trasferimento nucleare

La tecnica di base del trasferimento nucleare (NT) comporta il trasferimento del nucleo di una cellula diploide (set completo di cromosomi appaiati) in un ovocita enucleato (Fig. 4). L'embrione così ricostruito viene stimolato a crescere mediante impulso elettrico o tramite stimolazione chimica. Nella fase di pre-impianto gli embrioni sono mantenuti in un terreno di coltura particolare e successivamente gli embrioni sviluppati sono trasferiti nell'utero di una madre adottiva (Fulka J. et al, 2004).

Nel 1952 il trasferimento nucleare è stato utilizzato per studiare lo sviluppo embrionale precoce nelle rane (Briggs R. et al, 1952). Negli anni ottanta sono stati clonati bovini e ovini utilizzando cellule embrionali come cellule donatore. Nel 1997, Wilmut e colleghi hanno riportato la nascita del primo animale clonato con successo mediante trasferimento nucleare di cellule somatiche (SCNT) (Wilmut I. et al, 1997). Hanno usato cellule della ghiandola mammaria mantenute in fase G0 come cellule-donatore. Schnieke e colleghi hanno generato il primo agnello transgenico, Polly, utilizzando la tecnologia NT (Schnieke A.E. et al, 1997). Un anno dopo, il gruppo di Wakayama ha clonato topi mediante un'iniezione diretta di cellule somatiche in ovociti enucleati mediante manipolatore (Wakayama T. et al, 1998). Questo strumento ha consentito di rimuovere il nucleo dal ovocita di topo e di sostituirlo con il nucleo di una cellula somatica. Finora, varie specie di mammiferi sono stati clonati con successo con il SCNT, tra cui pecore, topi, bovini (Kato Y. et al, 1998), capre (Baguisi A. et al, 1999), maiali (Betthausen J. et al, 2000), gatti (Shin T. et al, 2002), conigli (Chesné P. et al, 2002), muli (Woods G.L. et al, 2003), cavalli (Galli C. et al, 2003), ratti (Zhou Q. et al, 2003), cani (Lee B.C. et al, 2005), e lupi (Kim M.K. et al, 2007). Purtroppo, il SCNT ha mostrato tassi di successo di clonazione portata a termine molto bassi. L'efficienza del trasferimento nucleare dipende da una serie di importanti variabili, sia tecniche che biologiche, come la qualità degli ovociti, l'enucleazione, le procedure di trasferimento nucleare e l'attivazione dell'ovocita. Inoltre, i topi clonati mostrano molte anomalie, soprattutto a livello di espressione genica (Bortvin A. et al, 2003), di placenta anormale (Tanaka S. et

al, 2001) e la morte precoce (Ogonuki N. et al, 2002). Wakayama e colleghi hanno dimostrato che l'efficienza di clonazione in topo potrebbe essere aumentata fino a cinque volte attraverso l'aggiunta dell'inibitore delle deacetilasi trichostatin-A (TSA) nel mezzo di attivazione dell'ocita (Kishigami S. et al, 2006). Pertanto, perché la riprogrammazione SCNT vada a buon fine, deve essere compiuto il corretto cambiamento epigenetico dei fattori di riprogrammazione dell'ocita, che inducono tutti i cambiamenti epigenetici che seguono, cioè la down-regolazione dei geni somatici e l'up-regolazione dei geni embrionali. Inoltre, le cellule ES possono essere derivate da blastocisti prodotte attraverso NT prendendo il nome di cellule NTES (Munsie M.J. et al, 2000; Wakayama T. et al, 2001). In contrasto con le anomalie osservate negli animali vivi clonati, le cellule NTES sono trascrizionalmente e funzionalmente indistinguibili dalle cellule staminali normali derivate da blastocisti fecondate, presumibilmente a causa di una selezione delle cellule completamente riprogrammate che avviene grazie al terreno di coltura. Nonostante questo notevole progresso, l'applicazione della clonazione terapeutica nei primati è rimasta una questione ancora discussa. L'approccio della clonazione terapeutica per la riprogrammazione di cellule somatiche umane in cellule pluripotenti simil-staminali pone problemi etici in quanto comporta la creazione e la successiva distruzione di ovociti ed embrioni vitali. Inoltre, la SCNT non riesce a produrre cloni fenotipicamente omogenei a causa del DNA mitocondriale degli oociti enucleati, che può causare vari disturbi della funzione cellulare ed alterazioni fenotipiche nella prole derivante. Per questi motivi la riprogrammazione per mezzo del SCNT è stata sostituita da altre tecnologie più sicure come la fusione cellulare di cellule staminali o la riprogrammazione diretta mediante particolari fattori di trascrizione.

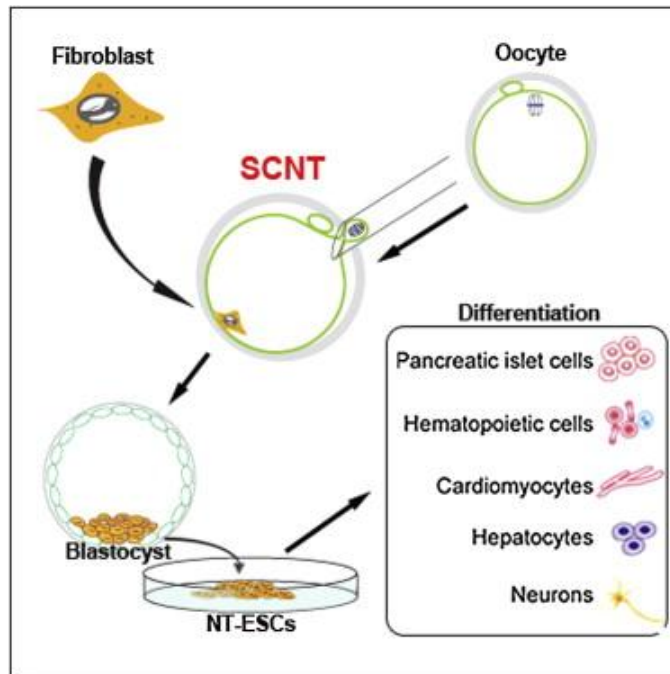


Figura 4. L'immagine mostra il processo di trasferimento nucleare in cui il nucleo di una cellula somatica viene inserito in un'ovocita non fecondata enucleata. Da questa nuova cellula si sviluppa un blastocisti da cui vengono derivate le ESC che successivamente possono essere differenziate in vari tipi cellulari (Tachibana M. et al, 2013).

1.2.2 Fusione cellulare

La tecnica della fusione cellulare, tra due o più diversi tipi di cellule, è stato suggerito già nel 1965. Dopo questo studio pionieristico, vari gruppi hanno dimostrato che le cellule staminali pluripotenti hanno una capacità intrinseca di riprogrammazione nucleare di cellule somatiche utilizzando la fusione cellulare. Pertanto, le cellule somatiche possono acquisire uno stato pluripotente dopo essere state fuse con cellule staminali pluripotenti come ES, embrionale germinali (EG) e cellule di carcinoma embrionale (CE) (Tada M. et al, 1997; Tada M. et al, 2001; Do J.T. et al, 2008). Tada e colleghi sono stati i primi a dimostrare la riprogrammazione nucleare di cellule somatiche generata mediante la fusione cellula-cellula. Hanno fuso cellule femminili EG, che sono cellule pluripotenti derivate da cellule germinali primordiali, con timociti di topi adulti (Tada M. et al, 1997). Queste cellule così ottenute erano tetraploidi e pluripotenti ed erano in grado di generare derivati di tutti e tre i foglietti embrionali nelle chimere

generate. È interessante notare che il pannello di metilazione dei geni *imprinted* risultava diverso tra le cellule ibride, cellule somatiche, EG e ES. La metilazione dei geni *imprinted* nelle cellule somatiche non risultava cambiata dopo la fusione con cellule staminali embrionali, ma cambiava dopo la fusione con le cellule EG: entrambi gli alleli, materno e paterno, risultavano demetilati. Questi risultati suggeriscono che eseguendo la fusione con le cellule EG è possibile ottenere anche modifiche nella metilazione delle cellule somatiche. Cowan e colleghi, hanno esteso questo lavoro anche all'uomo, dimostrando che la riprogrammazione nucleare di cellule somatiche umane può essere realizzata mediante fusione cellulare con cellule ES umane (Cowan C.A. et al, 2005). Le cellule ibride, generate con questa tecnica, presentano caratteristiche di pluripotenza, come l'inattivazione dei geni tessuto-specifici, la riattivazione dei geni di pluripotenza, inoltre sono in grado di differenziare nei tre foglietti germinativi e presentano un profilo epigenetico specifico delle cellule staminali embrionali umane. Inoltre, le cellule staminali pluripotenti di topo sono in grado di riprogrammare nuclei di cellule somatiche umane rendendo quest'ultime pluripotenti. Tale risultato indica che i fattori di riprogrammazione possono oltrepassare la barriera di specie (Johnson P.A., 2003). Per questi motivi le cellule ibride pluripotenti ottenute tramite fusione cellulare sono state utilizzate per studiare il meccanismo di riprogrammazione che ne sta alla base. Durante la riprogrammazione nucleare è necessario che la struttura della cromatina, che controlla il pattern di espressione genica e il funzionamento tessuto-specifico, deve essere significativamente modificata da due grandi eventi epigenetici: la metilazione del DNA e la modificazione degli istoni. Durante l'ibridazione delle cellule ES con i timociti, i fattori di riprogrammazione presenti nelle cellule ES portano ad un rimodellamento della cromatina delle cellule somatiche (Kimura H. et al, 2004).

L'ibrido di fusione ottenuto può essere una chimera, ma non contribuire alla linea germinale. Sebbene l'efficienza di riprogrammazione ottenuta con la fusione cellulare sia molto alta (circa 95 %), le cellule ibride risultanti non possono essere utilizzate per scopi terapeutici a causa della loro tetraploidia e

della presenza di geni esogeni dell'altra cellula utilizzata per compiere la fusione cellulare.

1.2.3 Riprogrammazione diretta mediante aggiunta di fattori di trascrizione

Tutti questi studi, mirati a creare cellule pluripotenti, hanno incoraggiato una "gara scientifica" per trovare i fattori necessari ad ottenere la riprogrammazione diretta di cellule terminalmente differenziate in cellule diploidi pluripotenti il più simili possibile alle cellule ES (Romli F. et al, 2012). Sulla base di un precedente lavoro pubblicato alla fine del 1980 in cui il fattore di trascrizione MyoD bastò per convertire i fibroblasti in mioblasti (Davis R.L. et al, 1987; Stadtfeld M. et al, 2010), vari gruppi di ricerca analizzarono i fattori di trascrizione espressi unicamente nelle cellule ES, ipotizzando che la loro espressione ectopica sarebbe stata sufficiente per conferire le caratteristiche tipiche delle cellule staminali a cellule terminalmente differenziate. Così non è stato fino a quando nel 2006, Shinya Yamanaka e colleghi hanno usato un approccio riduzionista per identificare i quattro fattori di trascrizione minimi che potessero essere sufficienti a riprogrammare dei fibroblasti ad uno stato di cellule staminali simil-ES., ed ha chiamato queste cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) (Takahashi K. et al, 2006). Gli esperimenti di Yamanaka hanno aperto la strada all'uso di cellule staminali per applicazioni terapeutiche personalizzate poiché, grazie ad adeguate condizioni di coltura, è possibile generare un numero indefinito di cellule paziente-specifiche.

2 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE

(iPS)

La prima prova che pluripotenza può essere indotta in cellule terminalmente differenziate è stata ottenuta grazie a esperimenti di clonazione (Campbell, K.H. et al, 1996; Gurdon J.B., 1962). Eppure non era chiaro quali fossero i fattori necessari a convertire cellule specializzate in cellule pluripotenti. Nel 2006, Takahashi e Yamanaka hanno individuato ventiquattro fattori di trascrizione che, somministrati ai fibroblasti di topo, portavano alla comparsa di alcune rare colonie di cellule pluripotenti, simili alle cellule ES. Queste cellule erano quasi indistinguibili dalle cellule staminali embrionali di topo, sia in termini morfologici che di potenziale di differenziamento; inoltre, esse erano in grado di differenziarsi in tutti e tre i foglietti embrionali e contribuire alla linea germinale delle cellule staminali di topo. Successivamente sono stati svolti scrupolosi esperimenti in cui un è stato rimosso un singolo fattore alla volta, fino a restringere la lista iniziale a quattro fattori: Oct4, Sox2, nonché gli oncogeni Klf4 e c- Myc (Takahashi K. et al, 2006). Poco dopo, Yamanaka e colleghi e un altro laboratorio indipendente, hanno dimostrato che che gli stessi fattori erano efficaci anche sulle cellule umane (Takahashi K. et al, 2007). Da allora, sono state sviluppate molte strategie alternative per la generazione di cellule iPS. Il metodo originale di Yamanaka prevedeva l'uso dei retrovirus, che garantivano un'integrazione permanente dei geni esogeni nel genoma dei fibroblasti riprogrammati (Takahashi K. et al, 2006). Il principale svantaggio di questo approccio era che l'integrazione virale risultava associata allo sviluppo di tumori. Ciò era dovuto all'espressione residua dei fattori di riprogrammazione nelle cellule differenziate, generate da cellule iPS (Yu J. et al, 2009). Queste considerazioni hanno spinto i ricercatori a perseguire diverse metodologie per fornire questi fattori ai fibroblasti da riprogrammare. Il primo protocollo che ovviava a questo problema è stato pubblicato dal gruppo di Hochedlinger, nel quale venivano usati virus non-integrativi per fornire i fattori di

riprogrammazione (Stadtfield M. et al, 2008). Successivamente altri studi hanno dimostrato che era possibile fornire gli stessi fattori di trascrizione anche sottoforma di proteine purificate (Zhou H. et al, 2009) o mRNA modificati (Warren L. et al, 2010) raggiungendo comunque con successo la riprogrammazione completa.

La plasticità delle cellule staminali umane pluripotenti indotte offre alcuni vantaggi nell'ambito della terapia clinica. Infatti, le cellule iPS non provocano rischio di rigetto immunitario se usate a scopo terapeutico, dal momento che sono cellule autologhe paziente-specifiche (Park I.H. et al, 2008; Dimos J.T. et al, 2008). Inoltre le cellule iPS, derivate da pazienti, offrono l'opportunità di ricreare *in vitro* la patologia specifica, permettendo quindi di compiere uno *screening* di farmaci personalizzato che si basa sulle differenze genomiche del paziente. In più, la capacità delle cellule di iPS di generare un modello di malattia *in vitro*, è molto importante per comprendere il meccanismo di patogenesi e la progressione della malattia, permettendo di sviluppare così nuove e più specifiche strategie terapeutiche (Dimos J.T. et al, 2008).

2.1.1 Fattori di riprogrammazione

Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*)

Conosciuto anche come Oct3 e Pou5f1, è un gene essenziale per lo sviluppo della massa cellulare interna dell'embrione e per la pluripotenza. È stato dimostrato essere presente come proteina negli oociti non fecondati e nelle cellule staminali. La sua mancanza provoca la differenziazione cellulare da staminale a componente trofoectodermica.

Klf4 (*Kruppel-like factor 4*)

A seconda del gene target e dell'interazione con altri fattori, può sia attivare che reprimere la trascrizione. Si suppone anche, che possa funzionare sia da oncosoppressore che da oncoproteina. Il suo ruolo esatto nella riprogrammazione è ancora da definire, ma una sua iperespressione forzata nelle

cellule staminali è stato dimostrato inibire la differenziazione nei progenitori eritroidi.

Sox2 (*Sex-determining region Y*)

È coinvolto nei processi di autorinnovamento delle cellule staminali e nel mantenimento della pluripotenza, assieme ad Oct4. È espresso anche in cellule non propriamente embrionali, come le TS (*trophoblast stem cells*) e le staminali neuronali, che riescono a autorinnovarsi.

C-Myc (*Cellular Myc gene*)

È un fattore di trascrizione pleiotropico legato a numerose funzioni cellulari, come la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione, la crescita e il metabolismo. Risulta più espresso nelle cellule che proliferano rapidamente e generalmente è assente nelle cellule in quiescenza. Da numerosi studi si è evidenziato che non è indispensabile come fattore di riprogrammazione, ma ne aumenta l'efficienza.

Nanog

Utilizzato assieme a Lin28, Oct4 e Sox2, ha permesso il *reprogramming* di cellule somatiche in staminali pluripotenti.

È stato descritto come un fattore necessario per il mantenimento della pluripotenza e dell'auto-rinnovamento delle ES, tuttavia sembra non essere del tutto necessario per la riprogrammazione. Per svolgere le sue funzioni coopera con i fattori Oct4 e Sox2.

Lin28

È una proteina che lega l'mRNA, è espressa nelle cellule staminali embrionali e in alcuni tipi di carcinoma. È un fattore utile alla generazione di iPS, anche se non strettamente necessario.

2.1.2 Vettori virali

- **Vettori retrovirali**

I vettori retrovirali sono ampiamente utilizzati come strumenti per il trasferimento di geni sia per la terapia genica clinica che per la ricerca di base grazie alla loro elevata efficienza di trasduzione e alla conoscenza del meccanismo d'integrazione. I vettori retrovirali utilizzati nei primi studi di riprogrammazione erano basati sul virus della leucemia murina di Moloney (MMLV), e il promotore dei transgeni era rappresentato dal *long terminal repeat* 5'MMLV (LTR), che normalmente viene silenziato nelle cellule ES. Infatti, i fattori di riprogrammazione vengono silenziati mediante metilazione del DNA nelle cellule iPS riprogrammate. Tuttavia, questo silenziamento del promotore MMLV LTR è spesso incompleto, per cui i geni endogeni non vengono attivati e il silenziamento incompleto può promuovere l'espressione dell'oncogene c-Myc durante la differenziazione delle cellule iPS, causando così la formazione di tumori in topi chimerici derivati dalle cellule iPS (Okita K. et al, 2007; Aoi T. et al, 2008). Alcuni studi si sono concentrati sulla produzione di cellule iPS che non dessero origine a formazioni tumorali in topi chimerici. A questo proposito è stato notato che riprogrammando cellule adulte senza l'uso del fattore c-Myc è possibile ottenere topi chimerici senza sviluppo di tumori, ma ciò ha portato ad una notevole riduzione dell'efficienza nella generazione delle iPSCs (Nakagawa M. et al, 2008). In seguito è stato dimostrato che il fattore c-Myc aumenta la formazione di tumori, ma diversi membri della famiglia Myc, come ad esempio L-Myc, promuovono la riprogrammazione delle cellule iPS senza però avere ripercussioni tumorigeniche sui topi chimera (Nakagawa M. et al, 2010). Inoltre, l'integrazione casuale di geni virali nel genoma della cellula ospite causa gravi modificazioni genetiche, come l'attivazione o inattivazione di geni normalmente silenziati nell'ospite, con conseguente formazione di tumori. Pertanto, la riprogrammazione mediante vettori retrovirali, dovrà superare grandi sfide prima di poter essere considerato un valido strumento per applicazioni cliniche. Per essere utilizzate in studi clinici, le cellule iPS devono essere generate in modo sicuro. Strategie alternative sono state perciò sviluppate fornendo i fattori di

riprogrammazione tramite vettori virali non integranti come vettori adenovirali o derivati dal virus del Sendai, oppure tramite espressione transiente di DNA plasmidico, proteine ricombinanti o miRNA sintetici.

- **Vettori lentivirali**

Per ovviare alla parziale riprogrammazione ottenuta, in molti casi con i vettori retrovirali, sono stati utilizzati anche vettori lentivirali costitutivamente attivi per produrre iPSCs ed essi sono risultati più efficienti dei vettori retrovirali (Brambrink T. et al, 2008; Sommer C.A. et al, 2010). L'uso di vettori lentivirali inducibili, la cui espressione può essere controllata dalla presenza del farmaco doxiciclina, riduce il rischio di una riattivazione dell'espressione del transgene e consente la selezione delle cellule iPS completamente riprogrammate, poiché la proliferazione delle cellule, che dipendono dall'espressione del fattore esogeno, è prontamente fermata non fornendo più la doxiciclina (Brambrink T. et al, 2008; Stadtfeld M. et al, 2008). I vettori lentivirali sono più efficienti rispetto ai vettori retrovirali nell'infettare i diversi tipi di cellule somatiche. E' possibile utilizzare un vettore lentivirale contenente una cassetta policistronica con tutti e quattro i fattori di riprogrammazione. Ciò permette di aumentare molto l'efficienza di riprogrammazione e di diminuire il numero di inserzioni nel genoma ospite (Carey B.W. et al, 2009; Sommer C.A. et al, 2009). I sistemi con vettori lenti virali inducibili (1) permettono, per la riprogrammazione di grandi quantità di cellule geneticamente omogenee per studi biochimici, (2) di riprogrammare cellule difficili da coltivare *in vitro* o da trasdurre e (3) permettono il confronto a livello genetico tra cellule iPS derivate da diversi tipi di cellule somatiche (Markoulaki S. et al, 2009). Inoltre, il gruppo di Townes ha generato cellule iPS utilizzando un vettore lentivirale auto-inattivante (SIN) che sfrutta il sistema della Cre/loxP ricombinasi (Chakraborty S. et al, 2013). Questa cassetta può essere rimossa tramite transfezione della Cre ricombinasi nelle cellule riprogrammate. Tuttavia, le cellule riprogrammate con questa metodica, spesso mostrano pattern eterogenei di espressione dei transgeni. Per questo motivo i cloni iPS devono essere sottoposti a screening per identificare quelli che hanno riattivato i fattori

di riprogrammazione in modo efficiente, il che risulta piuttosto laborioso e oneroso. Inoltre questo sistema può dare origine a problemi di mutazione inserzionale, interferendo con la trascrizione genetica e inducendo trasformazioni maligne. Ciò ne impedisce l'uso per applicazioni terapeutiche (Nakagawa M. et al, 2008).

- **Vettori adenovirali**

Per aggirare completamente il problema della mutagenesi inserzionale, molti gruppi hanno fatto ricorso a virus non integranti nel genoma ospite per veicolare i fattori di riprogrammazione nelle cellule somatiche. Il gruppo di Hochedlinger e il gruppo di Freed hanno generato cellule iPS riprogrammando, rispettivamente, epatociti di topo e fibroblasti umani utilizzando vettori adenovirali non competenti per la replicazione (Stadtfield M. et al, 2008; Zhou W. et al, 2009). La riprogrammazione con vettori adenovirali è altamente inefficiente (due ordini di grandezza inferiore a quella dei vettori retrovirali) e la trasduzione è limitata solo ad alcuni tipi di cellule permissive. L'efficienza di riprogrammazione così bassa è dovuta al fatto che questi vettori non riescono a sostenere l'espressione dei fattori di trascrizione per un tempo sufficiente affinché si riattivino i geni di pluripotenza endogeni, poiché i vettori virali vengono persi durante la duplicazione delle cellule trasdotte. Sebbene non si sia trovata alcuna prova di integrazione virale dopo numerose caratterizzazioni, è stata osservata un'alta frequenza di tetraploidia nelle cellule riprogrammate con questa metodica (Stadtfield M. et al, 2008).

- **Vettori derivati dal virus dei Sendai**

Il Sendai virus (SEV) è un altro virus non integrante che è stato utilizzato per riprogrammare cellule umane con maggiore successo rispetto agli altri metodi non integranti. (Fusaki N. et al, 2009; Seki T. et al, 2010). Il virus del Sendai è un virus a singolo filamento negativo di RNA, appartenente alla famiglia dei *Paramyxoviridae*, che infetta principalmente ratti e topi. Da pochi anni è stata generata una nuova classe di virus ricombinanti, non-trasmissibili (SeV) all'uomo,

che replica nel citoplasma delle cellule infettate senza passare attraverso una fase di DNA; Perciò il DNA non verrà mai prodotto né integrato nel genoma della cellula ospite durante la trasduzione, eliminando quindi il rischio di modificare il genoma ospite. Al contrario dei vettori adenovirali, i vettori derivati dal SeV possono sostenere un alto livello di espressione dei fattori di riprogrammazione, poiché sono vettori competenti per la replicazione. Un'altra caratteristica unica dei vettori derivati dal SeV è che permettono di ottenere un livello di espressione differenziato dei vari transgeni, semplicemente clonandoli in posizioni diverse. Infatti, modificando leggermente la stechiometria dei quattro fattori, si sono ottenute diverse efficienze di riprogrammazione e la migliore è ~10 volte superiore a quella dei vettori retrovirali. L'utilizzo di virus competenti per la replicazione, da un lato permette di ottenere un'efficienza di riprogrammazione molto alta, ma dall'altro rende molto difficile rimuoverli dalle cellule infettate. Poiché il genoma virale è stato trovato anche dopo 20 passaggi nelle cellule iPS, le cellule riprogrammate in cui sono ancora espressi i SeV possono essere rimosse attivamente per mezzo di una selezione negativa mediata da anticorpi. Recentemente, sono state sviluppate due varianti del vettore derivato dal virus del Sandai per superare questo problema (Seki T. et al, 2010, Nishimura K. et al, 2011). Sono state ottenute cellule iPS, con alta efficienza, utilizzando i vettori derivati dal SeV partendo da molti tipi di cellule somatiche come fibroblasti umani (Kudva Y.C. et al, 2012; Jin Z. B. et al, 2012; Nakamura N. et al, 2012), cellule umane periferiche del sangue (Seki T. et al, 2012; Daheron L. et al 2012), da mioblasti scheletrici umani (Trokovic R. et al, 2013.). Inoltre, grazie alle loro particolari caratteristiche, i vettori derivati dal SeV, sono stati utilizzati come vettori sicuri nel campo della terapia genica.

2.1.3 Vettori non virali

Produrre alti titoli virali è laborioso, richiede particolari conoscenze virologiche, ed è necessario rispettare rigidi protocolli per la biosicurezza. Inoltre, eventuali iPSCs derivate con sistemi virali, anche quelli in cui è stato eliminato il genoma virale, non saranno mai accettate per trials clinici senza un ulteriore controllo riguardo l'immunogenicità. Per generare iPSCs senza nessuna contaminazione virale, molti gruppi hanno cercato di modificare e utilizzare vettori di espressione basati sul DNA, tra cui plasmidi, vettori episomali, vettori minicircle, e trasposoni piggyBac.

- **Plasmidi a DNA**

In generale, la trasfezione transitoria di vettori di DNA è meno efficiente rispetto alla trasduzione virale. Tuttavia, il gruppo di Okita è riuscito a ottenere cellule iPS tramite trasfezioni multiple di due plasmidi contenenti rispettivamente il cDNA di Oct3/4, Sox2 e Klf4 e il secondo plasmide contenente il cDNA di c-Myc (Okita K. Et al, 2008). Per migliorare l'efficienza di riprogrammazione dei MEF, è stato utile usare una cassetta d'espressione policistronica, che assicura che ogni cellula trasfettata ottenga tutti i fattori in uguale numero di copie ed utilizzare trasfezioni ripetute per mantenere alto il livello di espressione dei fattori di riprogrammazione durante il primo periodo del protocollo di riprogrammazione che risulta essere il più critico. (Gonzalez F. et al, 2009). Tuttavia, applicando la stessa strategia ai fibroblasti umani non si è avuto lo stesso successo (Si-Tayeb K. Et al, 2010; Montserrat N. et al, 2011), probabilmente a causa del fatto che i fibroblasti umani sono notoriamente difficili da trasfettare con grandi costrutti di DNA e richiedono un'espressione prolungata dei fattori di Yamanaka per raggiungere la completa riprogrammazione (Maherali N. et al, 2008).

- **Vettori episomiali**

Un modo alternativo per sostenere un'espressione stabile dei fattori di riprogrammazione è l'uso di vettori episomiali non integranti derivati dal virus di Epstein-Barr (EBV).

Il vettore episomale che viene comunemente usato, è un plasmide a DNA contenente 2 elementi derivati dal virus di Epstein-Barr, cioè l'origine di replicazione virale (oriP) in cis e l'antigene nucleare 1 di EBV (EBNA1) in trans. OriP permette la replicazione del plasmide in cellule di mammifero e EBNA1 media la replicazione e il partizionamento del dell'episoma durante la divisione della cellula ospite. I vettori episomiali sono autosufficienti e grazie al loro tropismo sono in grado di essere utilizzati in una grande varietà di cellule. Un'altra caratteristica interessante dei vettori episomiali è che vengono automaticamente eliminati dalla cellula ospite e ad un ritmo che corrisponde perfettamente alle esigenze delle diverse fasi di riprogrammazione (Nanbo A. et al, 2007; Yu J. et al, 2009). Questo processo avviene lentamente nella fase iniziale di riprogrammazione perché le cellule somatiche hanno un ciclo cellulare più lungo e ciò è vantaggioso per il mantenimento di alti livelli di espressione dei transgeni per un periodo lungo. In cellule iPS completamente riprogrammate, l'espressione dei transgeni non è più necessaria ed infatti i vettori episomiali vengono persi spontaneamente dopo circa 2-3 mesi grazie alla rapida proliferazione delle iPSCs. La prima generazione di iPSCs è stata ottenuta da fibroblasti umani di prepuzio, utilizzando una combinazione di sette fattori (Oct4 , Sox2, KLF4 , c- MYC , NANOG , LIN28 e SV40 large T antigene). Dopo aver testato un ampio elenco di combinazioni e di modalità di trasfezione, sono state trovate tre condizioni che hanno dato luogo a iPSCs (Yu J. et al, 2009). L'efficienza di riprogrammazione era, però, piuttosto bassa (~ 0,0005 %, quindi circa 100 volte inferiore a quella del metodo retrovirale). Tuttavia, l'efficienza di riprogrammazione dei vettori episomiali può essere 100 volte più efficiente in cellule del midollo osseo e in cellule mononucleate del sangue del cordone (MNC) rispetto a quella in fibroblasti umani (Chou B.K. et al,

2011; Hu K. Et al, 2011). Inoltre, le iPSCs sono anche state derivate da cellule adulte di sangue periferico, offrendo così, un metodo promettente per ottenere iPSCs paziente-specifiche di alta qualità partendo da uno dei tessuti umani che è più facilmente accessibile (Chou B.K. et al, 2011). Ulteriori miglioramenti nel disegno vettoriale come l'inserimento di forti oncogeni come l'antigene T di SV40 (SV40LT), il silenziamento del gene p53 o l'uso del IRES2 (sito di inserzione interno al ribosoma che permette la co-espressione di 2 geni), hanno permesso di aumentarne l'efficienza. Ma per generare iPSCs prive di integrazione, senza l'utilizzo di fattori oncogeni che potrebbero compromettere la sicurezza del paziente, nuovi vettori sono stati ridisegnati con 2 importanti modifiche : (1) l'uso del promotore forte SFFV delle cellule ematopoietiche, invece di altri promotori relativamente deboli come CAG e (2) l'inclusione del WPRE alla valle del transgene. Questi cambiamenti hanno portato ad un aumento di più di 10 volte dell'efficienza di riprogrammazione nel generare iPSCs senza integrazione (Okita K. Et al, 2011).

- **Vettori minicircle e transposoni piggy-Bac**

I vettori *minicircle* sono cassette di espressione circolari derivati da normali plasmidi a cui è stata rimossa, attraverso ricombinazione intramolecolare, la struttura batterica. Rispetto ai normali plasmidi, i *minicircle* sono più piccoli e meno inclini al silenziamento. Entrambe queste caratteristiche li rendono interessanti per la riprogrammazione di cellule somatiche umane. Con questa metodica, sono state prodotte cellule iPS riprogrammando cellule staminali adipose umane con un vettore *minicircle* che esprimeva Oct4, Sox2, Nanog e Lin28 (Jia F. et al, 2010; Narsinh K.H. et al, 2011). Nonostante i miglioramenti apportati ai vettori plasmidici ed ai vettori *minicircle*, essi sono ancora molto poco efficienti rispetto a vettori retrovirali. Inoltre, il protocollo è complicato, richiede un gran numero di cellule di partenza e una fase di selezione mediante segnale fluorescente e trasfezioni multiple. Tuttavia, non è ancora chiaro se i *minicircle* saranno in grado di riprogrammare i fibroblasti umani adulti (Narsinh K.H. et al, 2011). Per evitare il grosso problema delle trasfezioni transienti e la rapida

perdita di fattori di riprogrammazione nelle cellule in divisione, sono stati sviluppati vari metodi per superare questo. Il trasposone Piggy-Bac è un elemento genetico mobile che traspone in modo efficiente tra vettori e cromosomi tramite un meccanismo di "taglia e incolla". E' altamente attivo nelle cellule di mammifero (Ding S. et al, 2005). Con l'espressione transitoria della trasposasi PB, i trasposoni piggy-Bac possono mediare l'integrazione stabile della cassetta di riprogrammazione nel genoma, mantenendo così un elevato livello di espressione dei fattori di Yamanaka. La cosa più importante, è che i trasposoni piggy-Bac possono essere asportati dalle cellule iPSC esprimendo transitoriamente la trasposasi PB, senza introdurre, così, alcuna mutazione inserzionale. Questa strategia è stata utilizzata per riprogrammare cellule di topo con efficienze che sono quasi paragonabili a quelle del metodo retrovirale (Yusa K. Et al, 2009; Woltjen K. Et al, 2009; Kaji K. Et al, 2009). In due casi, la maggior parte delle linee iPSC sono tornate differenziate dopo l'escissione del trasposone piggy-Bac. Ad oggi sono stati riportati solo due casi in cui si è ottenuta la riprogrammazione di fibroblasti embrionali umani utilizzando il sistema dei trasposoni piggy-Bac, ma in entrambi il protocollo è stato fermato prima dell'escissione del trasposone (Woltjen K. Et al, 2009; Kaji K. Et al, 2009).

- **Piccole molecole e composti chimici**

L'uso di piccole molecole e sostanze chimiche è ben documentata in letteratura. Queste sono stati utilizzati per migliorare l'efficienza di riprogrammazione per la generazione di cellule iPSC. L'idea, nell'uso di queste sostanze, è di sostituire gli originali fattori di riprogrammazione di Yamanaka e Takahashi con un cocktail di sostanze chimiche o molecole che servirà per migliorare il processo. Sono stati eseguiti molti screening per le sostanze chimiche e molecole che potrebbero migliorare la riprogrammazione. Alcuni gruppi hanno mostrato che le cellule progenitrici neurali (NPC), che esprimono in modo endogeno Sox2, dopo essere state trasdotte con Oct4 e Klf4, sono state riprogrammate con successo a iPSCs. Essi hanno inoltre dimostrato che questo processo è stato notevolmente favorito dalla presenza dell'inibitore dell'istone-metiltransferasi G9a BIX-01294 (BIX) (Shi

Y. Et al, 2008). Anche l'utilizzo dell'agonista del canale L del calcio, BayK8644 (BayK), non causa direttamente modificazioni epigenetiche, ma lavora a monte della cascata del segnale, evitando quindi modifiche indesiderate (Desponts C. et al, 2010). Altri ricercatori hanno ottenuto cellule iPS utilizzando delle nano particelle (Lee C. H. et al, 2011) e mediante l'integrazione di Klf4 con mezzi chimici (Lyssiotis C.A. et al, 2009), o sono riusciti a riprogrammare mioblasti murini soltanto grazie all'uso dell'inibitore della DNA metiltransferasi (DNMT) RG108, e successivamente a differenziarle in cellule progenitrici cardiache (Pasha Z. et al, 2011). La prima molecola che è stata usata per sostituire un fattore di riprogrammazione è stata chiamata RepSox2. Questa molecola è in grado di sostituire con successo il fattore Sox2, inibendo il segnale del fattore di crescita trasformante- β (TGF- β), che a sua volta induce l'espressione di Nanog. Dopo lo screening su circa 800 composti, i ricercatori hanno scoperto che era possibile generare cellule iPS mediante l'utilizzo di RepSox2 e di un altro composto chimico: l'acido valproico (VPA). Servendosi di questa piccola molecola è possibile riprogrammare senza dover utilizzare il fattore di riprogrammazione c-Myc, che genera problemi di trasformazione tumorale, pur non compromettendo l'efficienza di riprogrammazione (Ichida J. K. Et al, 2009). Le istone deacetilasi (HADC) come suberoilamide idrossamico acido (SAHA) e tricostatina A (TSA), oltre al VPA, hanno notevolmente migliorato efficienza di riprogrammazione (Huangfu D. et al, 2008). Altri ricercatori si sono concentrati nella ricerca di piccole molecole e mezzi chimici per indurre la pluripotenza nelle cellule in coltura e generare cellule iPS (Lin T. et al, 2009; Wang W. et al, 2011; Zhu S. et al, 2010). Molti studi stanno cercando composti in grado di sostituire o addirittura potenziare l'azione dei fattori di trascrizione noti o di aiutare a superare la bassa efficienza di riprogrammazione. Uno studio ha mostrato che la chinasi A Aurora, influisce negativamente sull'efficienza di riprogrammazione, inibendo l'inattivazione di inibitori di GSK3 β . Perciò, tali molecole, potrebbero aumentare notevolmente l'efficienza nella generazione delle cellule iPS. Inoltre sono state identificate altre molecole che inibiscono la formazione delle iPSCs, come p38 e l'inositolo trifosfato 3-chinasi (Li Z. et al, 2012). Metodi di riprogrammazione che

sfruttano piccole molecole o composti chimici sono considerati sicuri, in quanto non apportano modifiche permanenti al genoma delle cellule. Ciò nonostante, è stato dimostrato che la sostituzione di un fattore di trascrizione con un composto chimico comporta la formazione di un ridotto numero di cloni iPS e questo può indicare che un singolo composto può non essere in grado di sostituire interamente un fattore di trascrizione.

- **RNA**

I metodi di riprogrammazione non virali più all'avanguardia prevedono l'uso di molecole di RNA per ottenere cellule iPS. Recentemente sono stati riprogrammate cellule somatiche di topo ed umane mediante l'uso di miRNA con un'efficienza di riprogrammazione sorprendentemente alta. Tuttavia i miRNA sono stati forniti alle cellule somatiche sfruttando vettori virali integrativi invece che un'unica trasfezione dei miRNA maturi (Anokye-Danso F. et al, 2011). Successivamente il gruppo di Miyoshi è però riuscito a generare colonie di iPSCs grazie alla trasfezione diretta delle cellule somatiche umane con miRNA maturi (Miyoshi N. et al, 2011).

Già 14 giorni dopo la trasfezione è stata rilevata l'espressione della GFP (green fluorescent protein) legata ai mir-200c, mir-302 e dei miRNA della famiglia dei mir-369. A 15 giorni dalla trasfezione sono state osservate circa cinque colonie GFP-positive. L'efficienza di riprogrammazione appare paragonabile a quella ottenuta nei primi esperimenti di riprogrammazione mediata da retrovirus. Questi progressi nel campo della tecnologia delle iPS sono molto interessanti grazie alla mancanza di qualsiasi vettore e ciò significa nessun rischio di mutagenesi inserzionale. L'uso degli RNA sintetici permette anche di bypassare la risposta innata ai virus e generare cellule iPS prive di qualsiasi elemento esogeno. Il gruppo di Warren (Warren L. et al, 2010) ha generato cellule iPS con questo metodo con un'efficienza molto alta. I fibroblasti BJ sono stati trasfettati con un cocktail contenente gli RNA modificati dei cinque fattori di riprogrammazione (KMOSL). Lo studio ha dimostrato che le cellule iPS sono state generate con un'efficienza di due ordini di grandezza superiore a quella tipicamente riportata

per i metodi di riprogrammazione basati sui vettori virali ed inoltre, questo metodo è molto più rapido di tutti gli altri sistemi usati (15-18 giorni) (Miyoshi N. et al, 2011). E 'quindi chiaro che strategie basate sull'RNA, per generare iPSCs, sono molto promettenti per applicazioni cliniche.

2.2 APPLICAZIONI DELLE iPSCs E PROSPETTIVE FUTURE

Fin dai suoi inizi nel 2006, la tecnologia delle iPS ha visto molti progressi e l'entusiasmo ha alimentato l'esplosione di metodologie alternative per l'generazione di iPSCs, in particolare in ambito non virale. I tentativi di emulare il successo e l'efficienza della riprogrammazione virale, ma evitando l'integrazione di DNA indesiderato nel genoma dell'ospite, hanno spinto questo campo fino al punto in cui si trova attualmente. La vasta gamma di strategie non virali che sono state avanzate per risolvere questo problema, dimostra l'impegno e la fede che la comunità scientifica ha riposto nella tecnologia iPS. Le applicazioni che possono derivare da questi studi sono modelli di malattia ed ingegneria rigenerativa dei tessuti che rappresentano un contributo di vitale importanza per il progresso della scienza medica. Anche se questo lavoro è ancora agli albori, il conferimento del Premio Nobel per la medicina a Yamanaka per il suo lavoro pionieristico nel campo, prospetta un luminoso futuro per la tecnologia delle iPS. Mentre in passato la ricerca si è focalizzata principalmente sull' aumentare l'efficienza di riprogrammazione e sull'eliminazione dei transgeni, ora si è cominciato a valutare la qualità di iPSCs generate in modo non virale (Sommer C.A. et al, 2010; Rhee Y.H. et al, 2011). Al fine di identificare la qualità migliore di iPSCs per le future applicazioni cliniche, è soprattutto importante eseguire una mappatura genetica delle iPSCs derivate con i diversi metodi per analizzarne le eventuali anomalie.

- **iPS e terapia e trapianto cellulare**

Fin dal primo studio nel 1998, le cellule staminali embrionali umane sono state identificate come la chiave per il trattamento di malattie attualmente incurabili, come il Parkinson e le lesioni del midollo spinale (Thomson et al. , 1998). Tuttavia, l'uso delle ESc umane presenta diversi problemi, tra cui le preoccupazioni etiche sull'utilizzo di embrioni umani e le preoccupazioni scientifiche circa il rigetto immunitario dopo il trapianto. La tecnologia delle iPSC ha tutte le caratteristiche necessarie per superare questi problemi. Nel 2007, si è avuta la prova del possibile uso terapeutico delle cellule iPS applicato al modello murino di anemia falciforme, una malattia genetica del sangue causata da un difetto nel gene della β -globina (Hanna et al., 2007). E' stata eseguita una correzione del gene mediante ricombinazione omologa in una linea di iPSC, ed in seguito le cellule corrette sono state trapiantate in topi mutanti, curando così la malattia. Questo è stato un esempio perfetto dell'applicazione della medicina rigenerativa mediante iPSC. Le malattie causate da singoli difetti genetici (monogeniche) possono essere affrontate mediante sostituzione del gene malattia in cellule autologhe. Rispetto agli allotrapianti da altri donatori, il trapianto autologo basato sulle iPSC, è un metodo vantaggioso in quanto il rischio di rigetto immunologico o la trasmissione di virus non identificati o altre forme di infezione, è trascurabile (Araki et al, 2013; Guha et al., 2013). Realisticamente però, utilizzando iPSCs autologhe da ogni individuo, si avrebbero costi sanitari molto alti. Inoltre, poiché sono necessari più di 3 mesi per generare iPSCs utilizzando i metodi attuali, il trattamento di alcuni disturbi, come le lesioni del midollo spinale, non potrebbe essere compiuto entro un periodo di tempo necessario. E' quindi importante considerare l'uso di linee iPSC allogeniche per applicazioni di medicina rigenerativa. Fortunatamente, un importante vantaggio della tecnologia delle iPSC è la vasta diversità dei donatori ed il facile accesso alle cellule di partenza. Prima di generare clone di iPSC per uso clinico, devono essere esaminati tutti dei donatori, come le loro condizioni di salute e il tipo di antigene leucocitario umano (HLA) espresso. Oltretutto, sulla base delle informazioni di donatori, è possibile stabilire se il numero di variazioni a singolo nucleotide

riscontrate nei cloni iPSC esistevano già nel donatore come mosaicismo somatico o se queste sono statei acquisite nel corso della formazione delle iPSC. Un altro punto di forza è l'abbondante disponibilità di molteplici cloni di ciascun donatore. Le cellule staminali pluripotenti umane generalmente mostrano variazioni clonali per quanto riguarda la predisposizione al *lineage* di differenziamento e ciò consente di scegliere le cellule che meglio si adattano ai fini dell'applicazione terapeutica (Osafune et al, 2008; Kajiwara et al, 2012). Sulla base dell'esperienza con trapianto il midollo osseo, in corrispondenza dei principali loci di HLA, tra cui A, B e DR, tra il ricevente e il donatore, dovrebbe suscitare meno rigetto immunitario dopo il trapianto. Quindi, allo stato attuale, il metodo più realistico per la terapia basata sulle iPSC deriva dalla raccolta di stock di iPSC da vari donatori HLA-omozigoti (Nakajima et al, 2007; Okita et al., 2011). Ci sono stati molti problemi nelle prime iPSCs umane, come l'integrazione dei vettori retrovirali, che ha comportato il rischio tumorigenico e la necessità di utilizzare dei mezzi di coltura, non ben definiti e contenenti siero, per sostenere la generazione delle iPSC. Nonostante ciò, molti dei problemi sono stati risolti da recenti innovazioni tecnologiche, come l'uso di plasmidi episomali che non si integrano nel genoma e mezzi di coltura liberi da fattori esogeni (Yu et al , 2009; Chen et al, 2011; Okita et al, 2011; Okita et al, 2013). Perciò c'è da aspettarsi che , nel prossimo futuro, sarà possibile generare iPSCs utilizzabili in pratica clinica conformi alle norme di buone fabbricazione (GMP – *Good Manufacturing Practice*). Una caratteristica distintiva della tecnologia iPSC è la grande varietà e diversità delle cellule di partenza. Le iPSCs umane dovrebbero idealmente essere ottenute utilizzando procedure mini-invasive che comportino il minor rischio possibile. Le iPSCs umane sono state derivate da fibroblasti dermici (Takahashi et al, 2007 ; Yu et al, 2007) . Una biopsia cutanea per prelevare i fibroblasti cutanei è un intervento relativamente poco invasivo su individui che altrimenti dovrebbero essere sottoposti a interventi chirurgici o trattamenti farmacologici ad alto rischio. Per individui sani, una biopsia può lasciare una cicatrice visibile e c'è sempre rischio di infezione, perciò è necessario scegliere con cautela il sito di prelievo. Il sangue del cordone ombelicale è una interessante fonte per generare

iPSCs (Giorgetti et al, 2009; Haase et al, 2009; Takenaka et al, 2009). Il sangue del cordone ombelicale, essendo ricco di cellule immature, può essere una sorgente adatta per l'applicazione della tecnologia delle iPSCs, poiché è facilmente disponibile e le cellule derivate da questo contengono meno mutazioni genetiche rispetto alle cellule somatiche adulte. D'altra parte, anche se le banche del sangue del cordone devono rifornirsi solo di cellule derivate da donatori apparentemente sani, è difficile rintracciare i donatori, a distanza di anni, per capire se sono ancora in buona salute. Il sangue periferico è un'altra promettente fonte di iPSCs. In particolare, i linfociti T possono essere convertiti in iPSCs, in modo riproducibile, utilizzando sistemi di espressione transiente (Okita et al, 2013; Seki et al, 2011). Poiché il riarrangiamento dei loci di del recettore delle cellule T è diverso in ogni linfociti T, e facilmente distinguibile, sarebbe facile monitorare e tracciare la clonalità delle iPSCs prodotte seguendo le norme GMP. Inoltre, è possibile confermare lo stato di salute di un donatore per mezzo della diagnosi medica e dell'anamnesi del paziente, almeno fino alla loro età attuale. Grazie alla minima invasività del prelievo venoso, è possibile prevedere la cooperazione di molti donatori sani. Ci sono grandi scorte di sangue e di sangue del cordone ombelicale in tutte le nazioni e per questo motivo il sangue può rappresentare una delle più interessanti e potenziali fonti a disposizione per la produzione di iPSCs per uso clinico.

- **Modelli di malattia e screening di farmaci**

Una credenza comune è che il trapianto di cellule corrette rappresenti la migliore applicazione medica delle iPSCs. In realtà, la creazione di modelli di malattia e lo screening di farmaci sono importanti tanto quanto la terapia cellulare (Yamanaka S., 2010). I modelli animali hanno contribuito enormemente ad una migliore comprensione dei meccanismi che stanno alla base delle malattie, ma vi sono molte limitazioni riguardo all'uso di modelli animali per ricreare in modo fedele e accurato le malattie umane. Per esempio, sono stati sviluppati un certo numero di farmaci che avevano mostrato effetti terapeutici in modelli animali di sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Purtroppo però, tutti non hanno mostrato

efficacia nei pazienti umani, sottolineando la necessità di modelli di malattia che siano costruiti utilizzando cellule umane (Desnuelle C. et al, 2001; Shefner J. M. et al, 2004). Dal 2008 due gruppi sono riusciti a creare linee di iPSC specifiche per una specifica malattia (Dimos J. T. et al, 2008; Park I. H. et al, 2008) e la ricostruzione *in vitro* delle varie fasi dell'atrofia muscolare spinale (SMA) E' stato il primo successo ottenuto in questo campo (Ebert A. D. et al, 2009; Ebert A. D. et al, 2012). Questi studi hanno dimostrato non solo la possibilità di riprodurre fenotipi di malattia utilizzando iPSCs derivate da pazienti, ma anche la potenziale applicazione di utilizzare queste cellule per lo screening farmacologico. Ad oggi, molte linee di iPSC paziente-specifiche sono state stabilizzate e utilizzate per creare modelli di malattia ed in futuro questa tecnologia potrà facilitare gli studi sulle malattie rare (Bellin M. et al, 2012). Una delle questioni cruciali riguardanti le iPSCs derivate da pazienti, è la necessità di un controllo adeguato. Sebbene le hESC e le iPSCs derivate da donatori sani siano facilmente disponibili, le rilevanti differenze dei vari background genetici, promuovono controversie riguardanti il loro uso per il confronto con le cellule malate. Le cellule dei familiari sani, come madri e fratelli, sono i migliori controlli che si possono utilizzare per il confronto, perché hanno meno differenze genetiche delle cellule prelevate da donatori malati. I recenti progressi nelle tecnologie di editing genetico che utilizzando le nucleasi zinc-finger e le talen, hanno reso possibile la correzione genica in linee iPSC paziente-specifiche (Hockemeyer D. et al, 2009; Hockemeyer D. et al, 2011) .

- **Gene editing**

Le nucleasi zinc-finger (ZFNs) e le nucleasi attivatrici effettrici dei segnali di trascrizione (Talens) rappresentano una potente classe di strumenti che stanno ridefinendo i confini della ricerca biologica. Queste nucleasi chimeriche sono composte da moduli di sequenze che legano in modo specifico il DNA, collegati a un dominio taglio del DNA non specifico. Le ZFNs e le Talens consentono una vasta gamma di modificazioni genetiche che sono rappresentate dall'induzione di rotture del DNA a doppio filamento che stimolano la riparazione, che avviene in modo omologo, di specifiche posizioni genomiche. Recentemente oltre alle ZFNs

e Talens sta emergendo un nuovo sistema costituito da sequenze regolatorie che si interpongono a corte sequenze palindrome ripetute (CRISPR) basate sulle DNA endonucleasi Cas, RNA-guidate.

SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è di riprogrammare fibroblasti umani a cellule staminali pluripotenti indotte (iPSc), in particolare per la terapia delle patologie delle piastrine.

A questo scopo le cellule staminali pluripotenti indotte saranno ottenute avvalendosi di metodi di riprogrammazione che sfruttano sia vettori integranti che non-integranti nel genoma ospite e saranno differenziate lungo in lineage ematopoietico allo scopo di ottenere megacariociti in grado di produrre piastrine.

MATERIALI E METODI

3 LINEE CELLULARI

HEK293T: Le HEK293T, “*human embryonic kidney*”(ATCC) sono cellule renali embrionali umane che derivano dalle cellule HEK293 infettate con il virus di SV40 e esprimono stabilmente l'antigene *large T antigen* di SV40. Sono molto resistenti e particolarmente adatte a operazioni di trasfezione (ATCC). Sono state coltivate in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, GIBCO, Life Technologies) al 10% (v/v) FBS (*fetal bovine serum*, GIBCO, Life Technologies), e 1% di penicillina e streptomina (10^4 u- 10^4 µg/ml) (GIBCO, Life Technologies).

HEK 293A: La linea cellulare HEK293A (QBIOGENE), deriva dalle HEK293 e facilita la produzione iniziale, l'amplificazione e la titolazione di adenovirus replicazione-non competenti. Le cellule presentano integrata stabilmente nel loro genoma una copia del gene E1 che provvede alla formazione delle proteine E1a e E1b necessarie alla formazione di adenovirus ricombinanti. Sono state coltivate in terreno DMEM addizionato di FBS 10% e 1% penicillina e streptomina (10^4 u- 10^4 µg/ml).

PLAT-A: La linea cellulare di packaging Platinum A (Plat-A, CELL BIOLABS) è basata sulle cellule 293T, ma è stata generata integrando un promotore EF1 α , che garantisce stabilità maggiore e l'espressione di proteine retrovirali *gag-pol* ed *env*. La formazione di retrovirus replicazione-competenti è evitata, in quanto sono usate solamente sequenze codificanti per proteine virali strutturali. Le Plat-A state coltivate in DMEM con 10% (v/v) FBS, 1% di penicillina e streptomina (10^4 u- 10^4 µg/ml), 1µg/mL di puromicina e 10 µg/mL di blasticidina.

BJ: La linea cellulare BJ è costituita da fibroblasti umani normali e non maligni (ATCC). Questi fibroblasti sono caratterizzati da un ciclo vitale molto più lungo rispetto ai normali fibroblasti umani e sono negativi per la telomerasi. Può dare origine a 72

mitosi prima di entrare in senescenza. Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM al 10% FBS (v/v) e 1% di penicillina e streptomicina (10^4 u- 10^4 µg/ml).

MRC-5: La linea cellulare MRC-5 (ATCC) è costituita da fibroblasti derivati da normale tessuto polmonare di un feto maschio caucasico di 14 settimane. Può dare origine a 42-46 mitosi prima di entrare in senescenza. Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM al 10% FBS (v/v) e 1% di penicillina e streptomicina (10^4 u- 10^4 µg/ml).

HFF: La linea cellulare HFF, "*human foreskin fibroblast*", deriva dal tessuto di prepuzio umano (ATCC). È stata coltivata in terreno DMEM a cui è stato aggiunto il 10% (v/v) di FBS e l'1% (v/v) di streptomicina e penicillina (10^4 u- 10^4 µg/ml).

BNL: La linea cellulare BNL, "*murine embryonic normal liver cell*", è costituita da cellule di fegato murino (GIBCO, Life Technologies). È stata coltivata in terreno DMEM a cui è stato aggiunto il 10% (v/v) di FBS e l'1% (v/v) di streptomicina e penicillina (10^4 u- 10^4 µg/ml).

MEF irradiati: i MEF, o "*mouse embryonic fibroblasts*", irradiati (GIBCO, Life Technologies) sono stati utilizzati come supporto di crescita o *feeder layer* per le iPSCs. Dopo aver trattato la plastica con gelatina allo 0.1% (Millipore) per 30 minuti a temperatura ambiente, la gelatina in eccesso è stata rimossa e vi sono stati piastrati i MEF precedentemente scongelati, ad una concentrazione di circa 10^6 per piastra da 10 cm. Il terreno utilizzato è DMEM addizionato del 10% (v/v) di FBS e l'1% (v/v) di streptomicina e penicillina (10^4 u- 10^4 µg/ml). Dopo 24 ore dalla semina i MEF sono pronti per l'utilizzo.

Cloni di iPSCs: Le linee cellulari di iPSC sono state coltivate in un substrato costituito da MEF inattivati e seminati in plastica rivestita di gelatina allo 0.1% (Millipore). Il terreno era costituito da DMEM F12 addizionato con il 20% di *knock out serum* (GIBCO, Life Technologies), 1% penicillina e streptomicina (10^4 u- 10^4 µg/ml), 1% di amminoacidi non essenziali (GIBCO, Life Technologies), 1% di glutamina (Glutamax 100x, GIBCO, Life Technologies), Beta-mercaptoetanololo

(GIBCO, Life Technologies) e *basic-FGF (recombinant human fibroblast growth factor, 10 µg, GIBCO, Life Technologies)* alla concentrazione di 10 ng/µl.

3.1 ESPANSIONE DELLE LINEE CELLULARI

Tutte le linee cellulari sopra elencate, fatta eccezione dei cloni di iPSCs, sono state coltivate su supporti di plastica di varia dimensione. Le cellule sono state staccate periodicamente dai supporti per evitare un'eccessiva confluenza. Per fare questo, il medium di coltura è stato aspirato, le cellule sono state lavate con PBS 1X e messe ad incubare a 37°C con tripsina (GIBCO, Life Technologies), enzima che permette il distacco delle cellule stesse. In seguito l'azione dell'enzima è stata neutralizzata aggiungendo del normale terreno. Si è proceduto quindi a riseminare le cellule alla diluizione desiderata.

Per espandere le iPSCs, dopo il primo lavaggio con PBS 1X, le cellule sono state messe ad incubare con collagenasi IV 1 mg/ml (GIBCO, Life Technologies) per 10 minuti a 37°C. Dopo aver aspirato l'enzima, si è proceduto alla rimozione meccanica delle stesse per mezzo di uno *scraper*. Le cellule sono infine state centrifugate a 1200 rpm per 3 minuti, risospese nel loro terreno e divise per l'adeguato numero di pozzetti (usualmente in rapporto 1 a 3 in cui precedentemente erano stati seminati i MEF come *feeder layer*).

4 VETTORI RETROVIRALI

4.1 PRODUZIONE DEI VETTORI RETROVIRALI

4.1.1 Caratteristiche dei vettori retrovirali

Sono stati utilizzati 4 tipi di plasmidi retrovirali pMIG Oct4, pMIG Sox2, pMIG Klf4 e pMSCV c-Myc (*Addgene*). Questi presentano oltre all'inserto specifico d'interesse anche la sequenza nucleotidica della proteina GFP (*green fluorescent protein*), la quale è in grado di emettere fluorescenza se colpita da una certa lunghezza d'onda, senza richiedere l'intervento di enzimi o substrati. L'indice di fluorescenza dalla GFP può essere sfruttato per valutare l'efficacia e la percentuale di trasduzione dei vettori retrovirali.

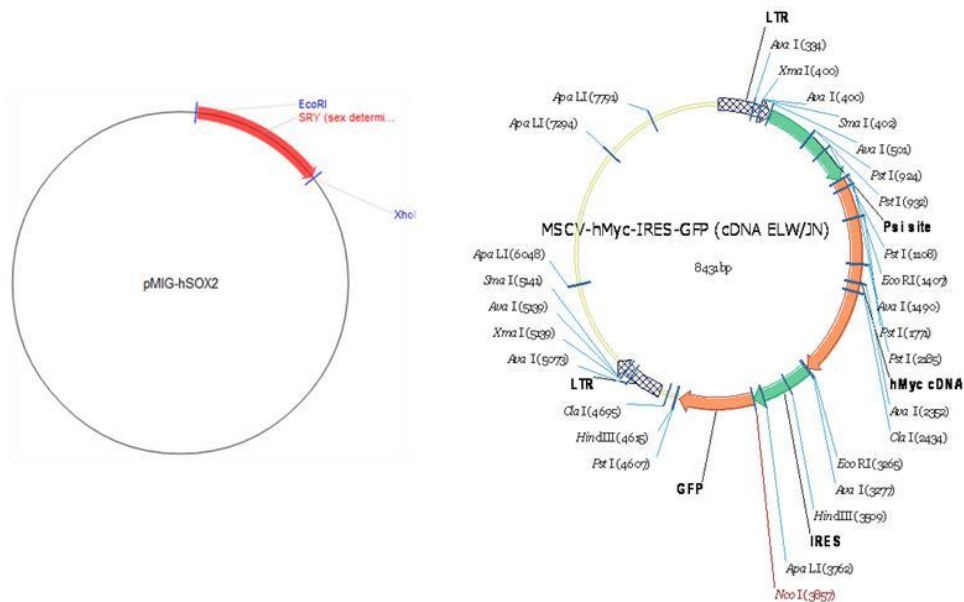


Figura 5: Esempio di mappa di plasmide pMIG, in questo caso con l'inserto Sox2 o SRY (*sex determining region*). L'inserto è compreso tra il sito di clonazione in 5' EcoRI e quello in 3' XhoI e mappa del vettore MSCV-hMyc-IRES-GFP che contiene il gene hc-Myc(www.addgene.com).

4.1.2 Amplificazione del DNA plasmidico

I ceppi batterici contenenti i plasmidi sono stati seminati su piastre di LB contenenti ampicillina (100 µg/ml) e lasciati crescere 16 ore a 37°C. È stata raccolta una colonia di batteri dalla piastra seminata il giorno precedente e poi stemperata in 2 millilitri di terreno LB contenente ampicillina, in modo da formare un pre-inoculo, lasciato almeno 8 ore a 37°C. Il pre-inoculo è stato quindi ulteriormente espanso trasferendolo in 250 ml di terreno LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e facendolo crescere per 16 ore a 37°C. Utilizzando il protocollo del kit Plasmid Maxi (QIAGEN), è stato estratto il DNA plasmidico, eluito in 100µL di buffer di eluizione e quantificato allo spettrofotometro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

4.1.3 Trasfezione di HEK293T e Plat-A con i vettori retrovirali

La trasfezione con vettori retrovirali è stata eseguita su cellule HEK293T e PLAT-A all'80-90% di confluenza utilizzando Lipofectamine™ 2000, una soluzione di lipidi cationici in grado di complessare il DNA, formando così dei lipoplessi che poi si fondono con la membrana citoplasmatica delle cellule e permettono al DNA esogeno di entrare nelle cellule. Ventiquattro ore prima della trasfezione, le cellule HEK293T e PLAT-A sono state seminate in 4 piastre Petri da 10 cm e coltivate in terreno DMEM al 10% (v/v) di FBS senza antibiotici. Il giorno successivo si è proceduto alla trasfezione delle stesse con i quantitativi di DNA plasmidico previsti dal protocollo, sotto elencati.

HEK293T				PLAT-A			
pDNA	pGAG-POL	pENV	OPTI-MEM	pDNA	pGAG-POL	pENV	OPTI-MEM
12 µg	10.5 µg	1,5 µg	Fino a 1 ml	30 µg	/	/	Fino a 1ml

Tabella 1: Descrizione dei quantitativi di DNA plasmidico, *gag-pol*, *env* e OPTI-MEM richiesti per la trasfezione dalle cellule PLAT-A e 293T.

La linea cellulare HEK293T richiede l'aggiunta di plasmidi esprimenti *gag-pol* e *VSV-G*, in quanto essa manca dei geni che codificano per queste proteine necessarie allo sviluppo dei virioni, mentre le PLAT-A ne sono provviste. Si procede quindi alla formazione dei liposomi, aggiungendo 75 μ l di lipofectamina (*Lipofectamine 2000 Transfection Reagent*, Life Technologies) a 925 μ L di OPTI-MEM (*reduced serum media*, GIBCO, Life Technologies) per reazione, invertendo delicatamente e lasciando incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Trascorsi i 5 minuti, i liposomi vengono aggiunti alla soluzione di OPTI-MEM a cui era stato preventivamente aggiunto il DNA plasmidico di tutti i vettori. La soluzione completa viene lasciata ad incubare a temperatura ambiente per 20 minuti, trascorsi i quali, viene depositata goccia a goccia sulle cellule adese che successivamente vengono poste in incubatore (Hereaus BDD 6220) a 37°C al 5% (v/v) di CO₂.

Allo scopo di eseguire una trasduzione comparata e valutare la miglior linea cellulare per la produzione dei retrovirus, le cellule sono state seminate su piastre da sei pozzetti alla concentrazione di 10⁵ per pozzetto le cellule HEK293T, MRC5 o HFF.

4.1.4 Saggio d'infettività dei fibroblasti

A 48 e 72 ore dalla trasfezione, il mezzo di coltura delle cellule di *packaging* (contenente i virioni) è stato raccolto, filtrato con filtri da 0,45 μ m, ed utilizzato per le trasduzioni delle linee cellulari MRC-5, HFF o HEK293A. Il terreno delle cellule da trasdurre è stato rimpiazzato con 600 μ l di sovrinatante di ciascun virus, eccetto c-Myc, di cui sono stati aggiunti solamente 200 μ l più 400 μ l di terreno. Al terreno contenente i retrovirus è stato inoltre aggiunto polibrene (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 5 μ g/ml, per aumentare l'efficienza di trasduzione. Dopo 6 ore dall'inizio della trasduzione, il terreno contenente i retrovirus è stato rimosso; è stato effettuato un lavaggio con PBS ed è stato ripristinato con DMEM al 10 % FBS e 1% di P/S. Le procedure di trasduzione

sopra elencate sono state ripetute alla seconda raccolta del surnatante delle cellule trasfettate.

Per testare l'efficienza di trasduzione dei singoli virus, ognuno dei quattro retrovirus è stato utilizzato per trasdurre un singolo pozzetto di cellule. Sono stati confrontati i risultati di diverse trasduzioni, in modalità standard, che prevede la sola incubazione delle cellule, e in modalità *spin-inoculation*, che prevede che le cellule trasdotte vengano sottoposte a un ciclo di centrifuga per 2 ore a 4°C e 1200 rpm.

Le cellule trasdotte sono state osservate al microscopio a fluorescenza (Leica, *Microsystems*), poiché l'integrazione del vettore virale nel genoma della cellula ospite permette l'espressione della proteina fluorescente GFP.

4.1.5 Produzione vettori retrovirali su larga scala

Per ottenere titoli virali molto alti da utilizzare nei protocolli di riprogrammazione, i vettori retrovirali sono stati prodotti su larga scala e tramite ultracentrifugazione i virioni prodotti sono stati concentrati in un volume ridotto. Quattro fiasche T75 di cellule HEK 293T sono state trasfettate con ogni vettore retrovirale, con i vettori di *packaging* e polibrene, come da protocollo precedentemente descritto. 48 ore dopo la trasfezione il surnatante è stato prelevato ed è stato ripristinato il terreno di coltura alle fiasche delle cellule HEK 293T. Il surnatante è stato conservato a 4°C fino al giorno successivo. Il giorno seguente il surnatante contenente i virioni è stato nuovamente prelevato e ultracentrifugato per 3 ore a 4°C alla velocità di 27000rpm utilizzando l'ultracentrifuga (Beckman Coulter). In questo modo le particelle virali si depositano sul fondo del tubo da ultracentrifuga. Il surnatante è stato quindi rimosso, facendo attenzione a non interferire con il pellet virale. Dopodiché il pellet costituito dai virioni retrovirali è stato risospeso in un centesimo del volume di partenza, poi aliquotato e conservato a -80°C.

4.2 RIPROGRAMMAZIONE MEDIANTE VETTORI RETROVIRALI

Due giorni prima della trasduzione con i 4 vettori retrovirali i fibroblasti BJ sono stati seminati in piastre da 6 pozzetti alla concentrazione di $1 \cdot 10^5$ cellule per pozzetto. Al giorno zero le cellule sono state trasdotte con tutti i vettori retrovirali prodotti in un volume finale di 600 μ l con l'aggiunta di polibrene alla concentrazione di 5 μ g/ml e trattate con protocollo *spin-inoculation*. Otto ore dopo la trasduzione il terreno di coltura è stato ripristinato con medium completo che è poi stato cambiato ogni 2 giorni. Il settimo giorno dopo l'infezione con i retrovirus la cellule trasdotte sono state staccate dal pozzetto e seminate in una piastra Petri da 10cm² in cui il giorno precedente erano stati seminati i MEF come *feeder layer* e coltivate in terreno specifico per le iPSCs. Due giorni dopo il terreno di coltura è stato cambiato e così ogni giorno fino alla comparsa, intorno al ventinovesimo giorno circa dalla trasduzione, delle prime colonie di iPSCs. Quest'ultime una volta cresciute sufficientemente verranno staccate, frammentate, espanse e caratterizzate.

5 VETTORI DERIVATI DAL SENDAI VIRUS

5.1 VETTORI VIRALI DERIVATI DAL VIRUS DEL SENDAI

Per il protocollo di riprogrammazione con questo tipo di vettori è stato utilizzato il kit commerciale *CytoTune-iPS Reprogramming Kit* (Life Technologies). Il kit fornito contiene i 4 vettori virali forniti in 4 differenti *vials* contenenti ciascuna 100 μ l del vettore ad una concentrazione $\geq 3 \times 10^7$ CIU/ml (*cell infectious unit/ 1 ml*). Essi esprimono ciascuno dei 4 fattori di Yamanaka, sono vettori non integranti, che rimangono nel citoplasma cellulare.

5.2 RIPROGRAMMAZIONE MEDIANTE VIRUS DEL SENDAI

Due giorni prima dell'infezione con i quattro vettori derivati dal virus del Sendai (CytoTune™, Life Technologies), contenenti rispettivamente i geni umani di Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, i fibroblasti BJ (ATCC) sono stati seminati in una piastra da 6 pozzetti ad una concentrazione di $2,5 \cdot 10^5$ cellule per pozzetto. Il giorno della trasduzione i fibroblasti sono stati trasdotti con tutti e 4 i vettori virali seguendo il protocollo del kit commerciale. Le cellule sono state successivamente mantenute in coltura con terreno DMEM 10% FBS e 1% P/S, cambiando il terreno di coltura ogni due giorni. Cinque giorni dopo la trasduzione è stato seminato su una piastra Petri da 10cm^2 un sottile strato di gelatina 0,1% (Life Technologies) e dopo averla fatta solidificare per 30 minuti a temperatura ambiente e tolto l'eccesso, vi sono stati seminati $5 \cdot 10^6$ fibroblasti murini irradiati PMEF (Millipore) in DMEM 10% FBS e 1% P/S. Sette giorni dopo la trasduzione con i 4 vettori virali, le cellule sono state staccate dal pozzetto mediante trattamento enzimatico con tripsina per 10 minuti a 37°C e trasferite nella piastra Petri da 10cm^2 contenente il feeder layer di MEF. Il medium di crescita è stato sostituito con il terreno specifico per le cellule iPS e cambiato ogni giorno finché, intorno al ventinovesimo giorno circa, le colonie hanno cominciato ad essere evidenti e sufficientemente grandi da poter essere prelevate ed espanse.

6 VETTORI EPISOMALI

6.1 PRODUZIONE VETTORI EPISOMALI

Allo scopo di riprogrammare i fibroblasti umani sono stati utilizzati 3 vettori episomali pCXLE contenenti rispettivamente i geni umani *Oct4* con un shRNA per p53 (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F), *Klf4* e *Sox2* (pCXLE-hSK) e *L-Myc* e *LIN28* (pCXLE-hUL).

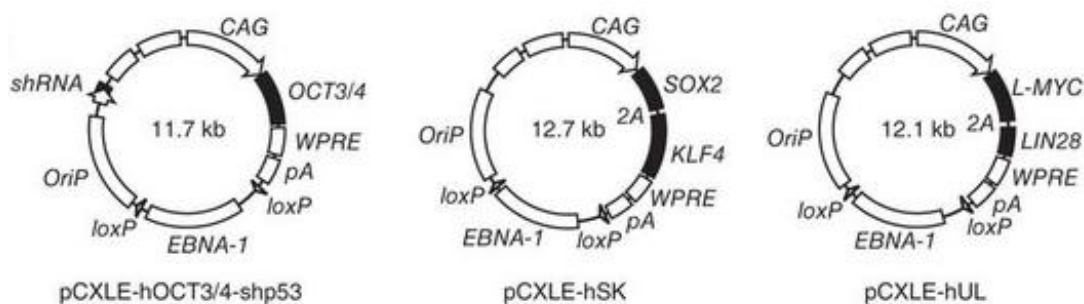


Figura 6: Mappa dei vettori episomali pCXLE utilizzati per gli esperimenti di riprogrammazione dei fibroblasti BJ. (Yamanaka S. et al., 2007).

6.1.1 Amplificazione DNA plasmidico

I ceppi batterici contenenti i plasmidi sono stati seminati su piastre di LB contenenti ampicillina (100 µg/ml) e lasciati crescere overnight a 37°C. È stata raccolta una colonia di batteri dalla piastra seminata il giorno precedente e poi stemperata in 2ml di terreno LB contenente ampicillina, in modo da formare un pre-inoculo, lasciato almeno 8 ore a 37°C. Il pre-inoculo è stato quindi ulteriormente espanso trasferendolo in 250 ml di terreno LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e facendolo crescere overnight a 37°C. Utilizzando il protocollo del kit Plasmid Maxi (Qiagen), è stato estratto il DNA plasmidico, eluito in 100µl di buffer di eluizione e quantificato allo spettrofotometro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

6.2 RIPROGRAMMAZIONE MEDIANTE VETTORI EPISOMALI

La riprogrammazione dei fibroblasti umani BJ con vettori episomali è stata ottenuta sfruttando la tecnologia della nucleofezione: un tipo di trasfezione che sfruttando impulsi elettrici e soluzioni saline e mediante l'utilizzo di speciali elettroporatori, permette al DNA esogeno di penetrare direttamente all'interno del nucleo.

Per compiere la nucleofezione è stato utilizzato il kit P2 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit (Lonza). Per ogni condizione 5×10^5 cellule BJ sono state tripsinizzate, centrifugate per 10 minuti a 1200rpm e successivamente il pellet è stato risospeso in 82µl di Nucleofector® Solution e 18µl di Supplement. Alla soluzione di cellule così ottenuta è stato aggiunto 1µg di ogni vettore episomale e 500µl di terreno senza antibiotici e il tutto è stato trasferito nella speciale cuvetta di nucleofezione ed è stato applicato il programma appropriato. E' stato utilizzato il plasmide pmaxGFP® fornito dal kit come controllo. Questo programma è stato individuato come il più adatto ad avere una buona resa di trasfezione e contemporaneamente una buona vitalità cellulare. Terminata la nucleofezione, sono stati aggiunti in ogni pozzetto 500µl di terreno DMEM completo, e quindi le due sospensioni cellulari sono state trasferite in una piastra 6-pozzetti, già contenente 1,5 ml di terreno/pozzetto e quindi messe in incubatore cellulare a 37°C con 5% di CO₂. Il giorno seguente il terreno di coltura è stato ripristinato con del DMEM completo. Cinque giorni dopo la trasfezione le cellule sono state tripsinizzate e seminate in una piastra Petri da 10cm² dove precedentemente era stato seminato il feeder layer di MEF. Due giorni dopo il terreno è stato sostituito con il terreno di coltura specifico per le cellule iPS e da questo momento è stato cambiato ogni giorno per circa un mese, fino a quando hanno cominciato ad essere visibili i primi cloni di iPSCs che sono stati prelevati ed espansi.

7 VETTORI ADENOVIRALI

7.1 PRODUZIONE DEI VETTORI ADENOVIRALI

7.1.1 Plasmidi per la produzione dei vettori adenovirali

I plasmidi adenovirali impiegati negli esperimenti sono pAd-Oct4, pAd-cMyc, pAd-Klf4 e pAd-Sox2 (Addgene).

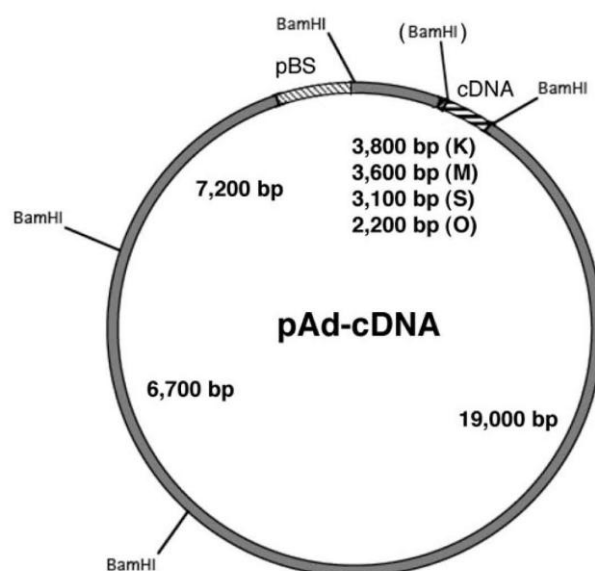


Figura 7: Esempio di mappa di un plasmide con inserto adenovirale Oct4. L'inserto è compreso tra il sito di clonazione in 5' MfeI e in 3' PacI (www.addgene.com)

7.1.2 Costruzione vettori adenovirali contenenti geni umani

Per poter riprogrammare fibroblasti umani, si sono costruiti dei vettori contenenti i fattori di riprogrammazione umani utilizzando il sistema AdEasy Adenoviral Vector Systems (Agilent Technologies). Sono stati digeriti con enzimi di restrizione i plasmidi episomali pCXLE per excidere la cassetta con i fattori di riprogrammazione umani. Sono state ottenute la cassetta contenente il gene Oct4, quella contenente la cassetta con il geni Sox2 e Klf4 e l'ultima con il gene c-myc. Tutte contenevano anche il gene reporter GFP a valle del transgene.

Le cassette così ottenute sono state successivamente ligate all'interno del vettore pShuttle, precedentemente digerito in modo opportuno. Dopodiché mediante ricombinazione omologa tra il vettore pShuttle e il vettore pAd-ESAY-1 si è ottenuto un vettore adenovirale contenente il transgene d'interesse, seguito dall'elemento IRES e il gene della GFP. I tre vettori così ottenuti sono stati successivamente amplificati, verificati e utilizzati per protocolli di riprogrammazione.

7.1.3 Amplificazione e analisi di restrizione del DNA plasmidico

La procedura di amplificazione del DNA plasmidico è stata effettuata seguendo lo stesso protocollo usato per i plasmidi retrovirali (paragrafo 3.2.1.2). Una volta accertata la quantità di plasmide ottenuto, si è proceduto all'analisi di restrizione dello stesso. Quest'ultima è stata effettuata per verificare che il plasmide estratto contenesse l'inserto desiderato. Si è proceduto alla restrizione dei plasmidi adenovirali utilizzando l'enzima BamHI (New England BioLabs), il buffer di restrizione appropriato (Neb III), l'aggiunta di BSA 10x e acqua incubando il tutto per 1 ora a 37 °C. I frammenti ottenuti sono stati caricati su di un gel di agarosio all'1%, confrontati con un *marker* di peso molecolare da 1kb (New England BioLabs) per verificarne il corretto peso molecolare.

7.1.4 Linearizzazione dei plasmidi adenovirali

La linearizzazione dei plasmidi adenovirali è stata effettuata per poter esporre le due ITR (*Inverted Terminal Repeat*). I plasmidi adenovirali sono stati digeriti con l'enzima Pac I per due ore a 37 °C. Per verificare l'avvenuta linearizzazione, i frammenti ottenuti sono stati caricati su di un gel di agarosio all'1% p/v e confrontati con un *marker* di peso molecolare da 1 kb. Una volta confermata la restrizione, il plasmide linearizzato è stato purificato del cosa? seguendo il protocollo QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), è stato eluito in 50µl di acqua sterile ed è quindi pronto per essere utilizzato per le procedure di trasduzione.

7.1.5 Trasfezione del genoma adenovirale ricombinante in cellule di packaging

In preparazione alla trasfezione, 15µg di ogni genoma adenovirale ricombinante sono stati digeriti con l'enzima Pac I, estratti con il QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Il plasmide linearizzato è stato risospeso in 30µl di acqua sterile. Ventiquattro ore prima della trasfezione $5 \cdot 10^5$ cellule della linea cellulare umana HEK293A sono state seminate in un pozzetto di una piastra da 6 pozzetti in 2 ml di terreno DMEM 10% FBS privo di antibiotici, così da ottenere circa l'80-90% di confluenza al momento della trasfezione. Al momento della trasfezione, si sono preparate due soluzioni in terreno DMEM privo di siero ed antibiotici, per un volume finale di 250 µl ognuna: nella prima si sono posti rispettivamente 1, 3 o 5µg di DNA adenovirale ricombinante linearizzato con Pac I mentre nella seconda si sono aggiunti 10µl di lipofectamina. Entro 5 minuti dalla loro preparazione, le due soluzioni sono state mescolate e lasciate a temperatura ambiente per 20 minuti. Al termine dell'incubazione, la miscela ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia al pozzetto contenente le cellule 293A. La piastra è stata poi posta in incubatore a 37°C, 5% CO₂ e dopo 5-6 ore il terreno è stato sostituito con DMEM completo. 72 ore dopo la trasfezione le cellule sono state tripsinizzate e seminate in una fiasca da 75cm² in 10 ml di DMEM 10% completo. Successivamente metà del terreno è stato cambiato ogni 3 giorni. Circa 8-10 giorni dopo la trasfezione, si è iniziato ad osservare l'effetto citopatico (CPE). Si è lasciata procedere l'infezione finché non si è osservato CPE in circa l'80% delle cellule (circa 12-15 giorni); le cellule sono state quindi raccolte e sono stati effettuati tre cicli di congelamento/scongelo (alternando immersione in azoto liquido e incubazione a 37°C) per favorire il rilascio dei virioni presenti all'interno delle cellule. Al termine della procedura i detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione a 3000 rpm per 15 min ed il surnatante contenente il virus ricombinante (crude viral lysate stock) è stato raccolto, filtrato con un filtro da 0,22µm, aliquotato e conservato a -80°C per la successiva amplificazione.

7.1.6 Amplificazione dell'adenovirus ricombinante

Allo scopo di generare un'adeguata quantità di virus, sono stati compiuti più cicli d'amplificazione utilizzando il seguente schema: sono state seminate $5 \cdot 10^6$ cellule HEK293A in alcune fiasche da 150cm^2 , il giorno successivo le cellule sono state infettate con 100 e 200 μl del crude lysate stock ottenuto dalla trasfezione, diluito in 15 ml di terreno DMEM completo allo scopo di valutare la quantità ottimale di crude lysate stock in grado di produrre l'effetto citopatico, senza uccidere tutte le cellule. Quando si è osservato l'80% di CPE (48-72 ore circa dopo l'infezione), il terreno è stato raccolto e le cellule di ogni fiasca, risospese in 1ml di terreno DMEM completo, sono state sottoposte a tre cicli di congelamento/scongelamento, centrifugate ed il surnatante ottenuto è stato titolato, aliquotato e conservato a -80°C .

7.1.7 Titolazione dell'adenovirus ricombinante mediante metodo Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID50)

Per stimare il titolo di adenovirus ricombinante ottenuto in seguito ad amplificazione è stato utilizzato il metodo TCID50, che si basa sull'osservazione dello sviluppo d'effetto citopatico in cellule HEK293A in seguito ad infezione con diluizioni seriali del virus. Ventiquattro ore prima dell'infezione una piastra da 96 pozzetti è stata seminata con $1 \cdot 10^4$ cellule HEK293A/100 μl DMEM 2%/pozzetto. Il giorno successivo 100 μl di adenovirus ricombinante da titolare sono stati diluiti in 900 μl di DMEM 2% (diluizione 10^{-1}). Tale soluzione è quindi stata sottoposta a diluizioni successive di un fattore 10 per ottenere concentrazioni virali decrescenti di un logaritmo fino alla diluizione 10^{-12} . In ogni fila di pozzetti della piastra da 96 sono stati aggiunti 100 μl /pozzetto per 10 pozzetti delle otto diluizioni virali più alte (dalla 10^{-5} alla 10^{-12}); gli ultimi due pozzetti d'ogni fila sono stati invece utilizzati come controllo negativo. La piastra è stata poi incubata a 37°C , 5% CO_2 per 10 giorni. Dopo tale periodo è stato osservato l'effetto citopatico (CPE) al microscopio ottico e si sono contati i pozzetti positivi per fila. Un pozzetto è stato considerato positivo per l'effetto citopatico anche se

solo poche cellule presentavano CPE. Il test è da ritenersi valido solamente se i controlli negativi non presentano CPE e la diluizione più bassa (10^{-5}) mostra il 100% d'infezione mentre la diluizione più alta (10^{-12}) non presenta alcun CPE. Il titolo virale viene quindi stimato mediante il metodo statistico di Kärber:

$$T=10^{1+d(S-0,5)+1} \text{ TCID50/ml}$$

d= Log_{10} della diluizione (=1 per diluizioni di fattore 10)

S=somma dei rapporti di pozzetti CPE+/fila per ogni diluizione (dalla 10^{-1} alla 10^{-10})

In seguito si converte il titolo virale in PFU/ml sottraendo 0,7 Log al titolo calcolato come TCID50/ml ($1 \times 10^{T-0,7}$). Per effettuare la colorazione della piastra e rendere evidenti le placche formatesi, le cellule sono state fissate tramite una soluzione di acetone e metanolo in rapporto 1:2 (200 μ l per pozzetto) e lasciate a incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Dopo due lavaggi con PBS, i pozzetti sono stati colorati con 60 μ l di una soluzione 0,1% di cristal-violetto.

7.1.8 Saggio d'infettività su HFF e BNL

Al fine di determinare la minima quantità di particelle adenovirali necessarie per assicurare un'efficienza di trasduzione delle cellule BNL e HFF pari o superiore al 95%, 1×10^4 cellule per pozzetto sono state trasdotte con 100, 200 o 500 MOI di adenovirus ricombinante diluito in DMEM al 2% FBS, 1% P/S. Alcuni pozzetti non infettati sono stati utilizzati invece come controllo negativo. 72 ore dopo la trasduzione, le cellule sono state lavate con PBS, fissate con una soluzione di paraformaldeide 4% v/v per 20 min a temperatura ambiente, e analizzate mediante analisi di immunofluorescenza.

7.1.9 Immunofluorescenza (IF)

Al fine di valutare la presenza delle proteine in esame e l'efficienza di trasduzione dei virus adenovirali nei due tipi di cellule trasdotte, sono stati eseguiti saggi di immunofluorescenza. A tale scopo le cellule trasdotte sono state fissate per 10 minuti in PFA 4% p/v pH 7.3 e successivamente permeabilizzate per 15 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di PBS 0,1% v/v di Triton X-100 (BM Biomedicals). In seguito, per bloccare legami aspecifici, è stata effettuata un'incubazione overnight a 4°C in una soluzione di PBS al 5% p/v di FBS, in camera umidificata per prevenire il disseccamento delle cellule. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con anticorpo primario diretto contro la proteina d'interesse (Tab. 2) opportunamente diluito in PBS al 5% p/v di FBS. Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente, le cellule sono state accuratamente lavate (Sigma Aldrich) e quindi incubati per un'ora al buio, in camera umidificata, con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con fluoroforo alla diluizione adeguata (Tab. 3). Le cellule sono state poi lavate con PBS al 0,05% v/v di Tween20 per tre volte. Al fine di visualizzare i nuclei, le cellule sono state trattate per 10 minuti, al buio, a temperatura ambiente, con l'intercalante DAPI 1000X (4',6 diamidino-2-fenilindolo dilattato) (Life Technologies), che si lega a regioni specifiche A-T nella doppia elica del DNA. Dopo il lavaggio, le cellule sono state montate su vetrini portaoggetto. I vetrini sono quindi stati analizzati mediante microscopio a fluorescenza (Leica). Le immagini sono state paragonate ad un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario

Anticorpo primario	Tipologia anticorpo	Diluizione	Ditta
Anti-cMyc	<i>rabbit polyclonal</i>	1:200	Santa Cruz
Anti-Klf4	<i>rabbit polyclonal</i>	1:200	Santa Cruz
Anti-Oct3/4	<i>mouse monoclonal</i>	1:200	Santa Cruz
Anti-Sox2	<i>rabbit polyclonal</i>	1:200	Millipore

Tabella 2: Anticorpi primari utilizzati nell'analisi di immunofluorescenza su vettori adenovirali

Anticorpo secondario	Tipologia anticorpo	Fluoroforo	Diluizione	Ditta
Anti-Oct4	<i>goat</i>	Alexa 488	1:500	Life Technologies
Anti K-S-M	<i>rabbit</i>	Alexa 546	1:500	Life Technologies

Tabella 3: Anticorpi secondari utilizzati nell'analisi di immunofluorescenza su vettori adenovirali

7.2 MESSA A PUNTO PROTOCOLLO DI RIPROGRAMMAZIONE CON ADENOVIRUS RICOMBINANTI

Al fine di riprogrammare i fibroblasti BJ con i vettori adenovirali sono state seminate $2 \cdot 10^6$ cellule BJ/pozzetto in una piastra da 6 pozzetti e il giorno successivo sono state infettate con tutti e tre i vettori adenovirali contenenti rispettivamente i geni umani *Oct4*, *Sox2* e *Klf4* e *c-Myc*. Inizialmente i fibroblasti sono stati trasdotti con due differenti concentrazioni di virus: ad una MOI totale di 150 e 300 in un volume finale di 600 μ l per pozzetto. Quattro ore dopo l'infezione sono stati aggiunti 2ml di DMEM completo per pozzetto e il giorno seguente il terreno di coltura contenente i virus è stato sostituito con terreno fresco. Questo protocollo ha generato molta citotossicità sulle cellule infettate, per cui si è proceduto cambiando la strategia d'infezione.

Nei seguenti esperimenti sono state seminate $5 \cdot 10^4$ fibroblasti BJ/pozzetto direttamente sulla matrice di Matrigel in una piastra da 6 pozzetti e successivamente sono stati infettati per 6 volte consecutive, a distanza ciascuna di tre giorni, a differenti MOI totali: 15, 30, 45 e 60 rispettivamente. In seguito, dopo 4 ore dall'infezione, il terreno di coltura è stato ripristinato con terreno fresco. Dopo la quarta trasduzione il terreno DMEM completo è stato sostituito con il terreno di coltura specifico per le cellule iPS per permettere la riprogrammazione ed è stato cambiato ogni giorno. I fibroblasti trasdotti sono stati mantenuti sotto monitoraggio continuo per osservare qualsiasi cambiamento morfologico ed eventualmente la comparsa di colonie di iPSCs.

8 CARATTERIZZAZIONE CLONI iPSCs

8.1 TEST DELLA FOSFATASI ALCALINA

La fosfatasi alcalina (AP) è un marcatore fenotipico delle cellule staminali (PSCs), incluse le cellule staminali embrioniche indifferenziate (ESCs), cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) e cellule germinative embrionali (EGCs). Questo tipo di marcatura è specifica per le PSCs e permette di distinguerle dai fibroblasti embrionici murini (MEF) utilizzati usualmente come feeder layer. Per verificare la staminalità dei cloni di iPSCs ottenuti con i differenti metodi di riprogrammazione è stato utilizzato il kit Alkaline Phosphatase Live Stain (500X) (Life Technologies) che permette di marcare in modo fluorescente le cellule pluripotenti senza dover fissare le cellule, per cui le colonie possono essere utilizzate per le analisi di caratterizzazione successive. I cloni di iPSCs sono stati coltivati sul feeder layer di MEF con il terreno specifico per le cellule iPS. Prima di procedere con la marcatura le colonie vengono lavate 3 volte con DMEM/F12 e incubate 30 minuti a temperatura ambiente con il reagente AP live stain (500X) diluito 500 volte in DMEM/F12. Dopo l'incubazione con l'AP, il reagente è stato rimosso e le colonie sono state lavate 2 volte con DMEM/F12. Le colonie marcate sono state analizzate al microscopio a fluorescenza (Leica) usando il filtro FITC standard.

8.2 IMMUNOFLUORESCENZA PER I MARCATORI DELLA PLURIPOTENZA

E' stata svolta sui cloni di iPSCs un'analisi dei marcatori di pluripotenza mediante immunofluorescenza per verificare che le colonie siano staminali e pluripotenti. L'analisi è stata compiuta su cloni coltivati in piastre da 24 pozzetti, su feeder layer di MEF in terreno specifico per cellule iPS. Il terreno di coltura è stato rimosso dai pozzetti e le cellule sono state fissate per 20 minuti in PFA (Sigma

Aldrich) 4% p/v pH 7.3 e successivamente permeabilizzate per 15 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di PBS 0,1% v/v di Triton X-100 (BM Biomedicals) per permettere agli anticorpi di entrare meglio attraverso la membrana plasmatica. In seguito sono stati effettuati 3 lavaggi con una soluzione di PBS 0,05% v/v di Tween20 (Sigma Aldrich). Successivamente i siti aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di PBS 4% p/v BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma Aldrich) (Nanog, SSEA3, SSEA4 e TRA 1-60), oppure overnight a 4°C in una soluzione di PBS 4% p/v di FBS (Oct4). Dopo il bloccaggio i cloni sono stati incubati con l'anticorpo primario corrispondente alla giusta diluizione (Tab. 3) diluito in PBS 4% p/v di FBS per un'ora a temperatura ambiente (Oct4), oppure diluito in PBS 4% p/v BSA overnight a 4°C (Nanog, SSEA3, SSEA4 e TRA 1-60). Dopo 3 lavaggi con PBS 0,05% v/v di Tween20, per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario, i cloni sono stati trattati con il corrispettivo anticorpo secondario (Tab. 4), coniugato con fluoresceina e diluito in PBS alla giusta diluizione, per un'ora in camera calda al buio. Dopo altri 3 lavaggi con la soluzione di PBS 0,05% v/v di Tween20 è stata compiuta una marcatura nucleare utilizzando un colorante fluorescente DAPI 1000x (4', 6-Diamidino-2-fenylindole dilattato Life technologies). Questo colorante è un intercalante che lega in modo specifico le regioni AT della doppia elica di DNA. Le cellule sono state incubate al buio con il colorante DAPI per 10 minuti a temperatura ambiente e poi lavate con PBS. Concluse tutte le procedure di incubazione i cloni sono stati osservati con il microscopio a fluorescenza (Leica).

Anticorpo primario	Tipologia anticorpo	Diluizione	Ditta
Anti-Oct4	<i>mouse monoclonal</i>	1 : 200	Santa Cruz
Anti-Nanog	<i>rabbit polyclonal</i>	1 : 50	Abcam
Anti-SSEA3	<i>rat polyclonal</i>	1 : 50	Abcam
Anti-SSEA4	<i>mouse monoclonal</i>	1 : 50	Abcam
Anti-TRA 1-60	<i>mouse polyclonal</i>	1 : 50	Abcam

Tabella 3: Anticorpi primari utilizzati nell'analisi di immunofluorescenza su cloni iPS.

Anticorpo secondario	Tipologia anticorpo	Fluoroforo	Diluizione	Ditta
Anti-Oct4, SSEA4 e	<i>goat</i>	Alexa 488	1 : 500	Life Technologies
Anti- TRA 1-60	<i>goat</i>	Alexa 488	1 : 250	Life Technologies
Anti-Nanog	<i>rabbit</i>	Alexa 546	1 : 500	Abcam
Anti-SSEA3	<i>rat</i>		1 : 500	Santa Cruz

Tabella 4: Anticorpi secondari utilizzati nell'analisi di immunofluorescenza su cloni Ips.

8.3 ANALISI MARCATORI DELLA PLURIPOTENZA MEDIANTE RT-PCR

I cloni iPS sono stati coltivati su una matrice, come feeder layer, chiamata *Matrigel™ Basement Membrane Matrix* (BD Bioscience) e coltivati in terreno di coltura specifico per tale matrice chiamato mTeSR™1 (StemCell Technologies) fino al raggiungimento della confluenza delle colonie. Successivamente le colonie sono state staccate dalla matrice con metodo enzimatico mediante Collagenasi di tipo IV (Gibco, Life Technologies), l'RNA è stato estratto dalle cellule e retrotrascritto. È stata poi svolta un'analisi di tutti i marcatori di pluripotenza tipici delle cellule staminali (Dnmt3b, hTERT, Nanog, Oct4, Rex1 and Sox2) mediante PCR.

8.3.1 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dai pellet di cellule utilizzando il kit RNAasy Mini Kit (Qiagen) ed è stato eluito in 30µl di acqua DEPC. Il protocollo di purificazione comprende una fase di trattamento con DNase, utile per ridurre sostanzialmente eventuali contaminazioni di DNA genomico. L'RNA totale estratto è stato quindi conservato a -80°C. La quantità dell'RNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica (NanoDrop® ND-1000) alla lunghezza d'onda di 260 nm, mentre la purezza è stata stimata tramite i rapporti d'assorbanza A260/A280 e A260/A230

8.3.2 Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA impiegando la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina (MuLV) e utilizzando primers universali (random). Tutte le procedure sono state eseguite in cappa a flusso laminare al fine di evitare contaminazioni. Per la retrotrascrizione (RT) si prepara una miscela costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 2,5 µM oligonucleotidi innesco universali (Random hexamers), 60 U inibitore dell'

RNasi , 125 U di trascrittasi inversa MuLV, 2 µg di RNA estratto ed acqua MilliQ fino ad un volume finale di 100 µl. La miscela viene quindi posta in termociclatore (Mastercycler® Personal, Eppendorf®) per 10 minuti a 25°C seguiti da 60 minuti a 48°C e 5 minuti a 95°C.

Successivamente, 5 µl di cDNA così ottenuti sono stati amplificati utilizzando primers specifici per valutare la presenza dell'mRNA dei geni d'interesse utilizzando oligonucleotidi di sintesi disegnati in base alla sequenza genica codificante la proteina d'interesse ricavata dall'analisi della GenBank. La reazione d'amplificazione (polymerase chain reaction, PCR) è stata condotta in 50µl di volume finale. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore con 40 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 30 secondi di denaturazione del cDNA a 95°C, ed 1 minuto di appaiamento/estensione alla temperatura indicata. Gli amplificati così ottenuti sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% (p/v) (Seakem, FMC), addizionato di Gel Red (DB) e visualizzati mediante transilluminatore a raggi UV.

8.4 FORMAZIONE DI EMBRYOID BODIES

L'*embryoid bodies test* (o test dei corpi embrioidi) è un test di differenziamento delle iPSCs che permette di valutare l'espressione dei marcatori dei tre diversi foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma ed endoderma) e confermare quindi la pluripotenizialita' delle iPSC stesse. Le colonie di iPSCs ottenute dopo riprogrammazione dei progenitori cardiaci, sono state lavate con PBS 1X e trattate con collagenasi IV per 10 minuti a 37C. Sono state quindi staccate meccanicamente attraverso l'utilizzo di *scrapers*, e centrifugate a temperatura ambiente per 5 minuti a 1200 rpm. I pellet cellulari sono stati delicatamente risospesi in terreno per le iPSC in assenza della b-FGF, in modo da permettere la differenziazione cellulare, e sono stati seminati in un *6-well ultra low attachment*, per far crescere le cellule in sospensione e in forma di corpi embrioidi. Il terreno è stato cambiato ogni 3 giorni. Dopo 7 giorni le cellule sono state staccate e riseminate su gelatina allo 0,1% in DMEM al 10% di FBS, 1% P/S,

per permettere la crescita in adesione e facilitare la differenziazione nei tre tipi di foglietti germinativi. Il terreno è stato nuovamente cambiato ogni 3 giorni e, allo scadere del settimo giorno, le cellule sono state raccolte tramite trattamento enzimatico.

8.4.1 RT-PCR e PCR

Per verificare la capacità delle cellule iPS ottenute di differenziare in ogni tipo cellulare proveniente da ogni foglietto germinativo è stata condotta un'analisi, mediante reazioni PCR, dei principali geni di differenziamento dei tre foglietti germinativi. Una volta raccolte le cellule, è stato estratto l'RNA e in seguito retrotrascritto come precedentemente descritto (cap 6.3.1 – 6.3.2). Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato come *template* dell'amplificazione dei marcatori specifici dei tre foglietti germinativi ectoderma (PAX6, b-Tubulina), endoderma (AFP, GATA4) ed mesoderma (Flk1, GATA2, PECAM, VE-CAD). Le reazioni di PCR sono state effettuate seguendo le condizioni di reazione specifiche per ogni gene.

9 DIFFERENZIAMENTO DELLE iPSCs IN

MEGACARIOCITI

Le cellule iPS ottenute dalla riprogrammazione con vettori episomali sono state staccate dalla matrice Matrigel con l'enzima accutasi (*StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent* Life Technologies) che permette di ottenere singole cellule. Le cellule sono state poi riseminate in pozzetti da 24 pozzetti e trattate con il protocollo di differenziamento. Le cellule sono state coltivate 37°C al 5% CO₂ in terreno di coltura addizionato con 2mM L-glutammina, 100U/ml di penicillina, 100µg/ml di streptomina (Life Technologies) and l'1% selenio-insulin-transferrina (Life Technologies). Inoltre 50ng/ml di trombopoietina (TPO, Peprotech) and 10ng/ml di interleuchina-3 (IL-3, Peprotech) e 10ng/ml di fattore delle cellule staminali (SCF, Peprotech) che induce il differenziamento in megacariociti.

RISULTATI

10 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI RETRO-VIRALI

Il protocollo di riprogrammazione mediante l'uso di vettori retrovirali è stato eseguito come metodo standard di riprogrammazione di cellule somatiche. In questo esperimento sono stati utilizzati quattro diversi vettori retrovirali contenenti ognuno uno dei fattori di Yamanaka: pMIG-Oct4, pMIG-Sox2, pMIG-Klf4 e pMSCV-c-Myc IRES GFP.

10.1 CONFRONTO TRA SISTEMI DI PACKAGING: HEK293T E PLAT-A

Al fine di poter comparare i due sistemi di *packaging* HEK293T e PLAT-A e poterne valutare la migliore efficienza, le cellule sono state trasfettate con un vettore retrovirale ed è stata analizzata la produzione dei virioni. A 48 e 72 ore dopo la trasfezione, il surnatante contenente i virioni è stato raccolto, filtrato e utilizzato per trasdurre le cellule HEK293A seminate in piastre da 6 pozzetti, secondo il protocollo precedentemente descritto. Successivamente è stata analizzata l'intensità di fluorescenza della GFP delle cellule trasdotte con i due diversi sistemi di *packaging*. L'analisi compiuta al microscopio a fluorescenza, sulle cellule HEK293A trasdotte, ha dimostrato che le cellule trasdotte con i virioni prodotti con il sistema di *packaging* HEK293T mostrano un'espressione della GFP molto superiore rispetto a quelle trasdotte con i virioni prodotti con il sistema di *packaging* Plat-A (90% vs 50% cellule GFP-positive) (Fig. 8). Dopo ulteriori esperimenti le HEK293T si sono dimostrate il miglior sistema di *packaging* per la produzione di virioni retrovirali; inoltre, le cellule HEK293T si sono dimostrate molto più resistenti delle cellule Plat-A poiché durante la raccolta del vettore retrovirale risentivano meno dell'effetto citopatico e rimanevano più adese alla plastica anche dopo più raccolte di virus.

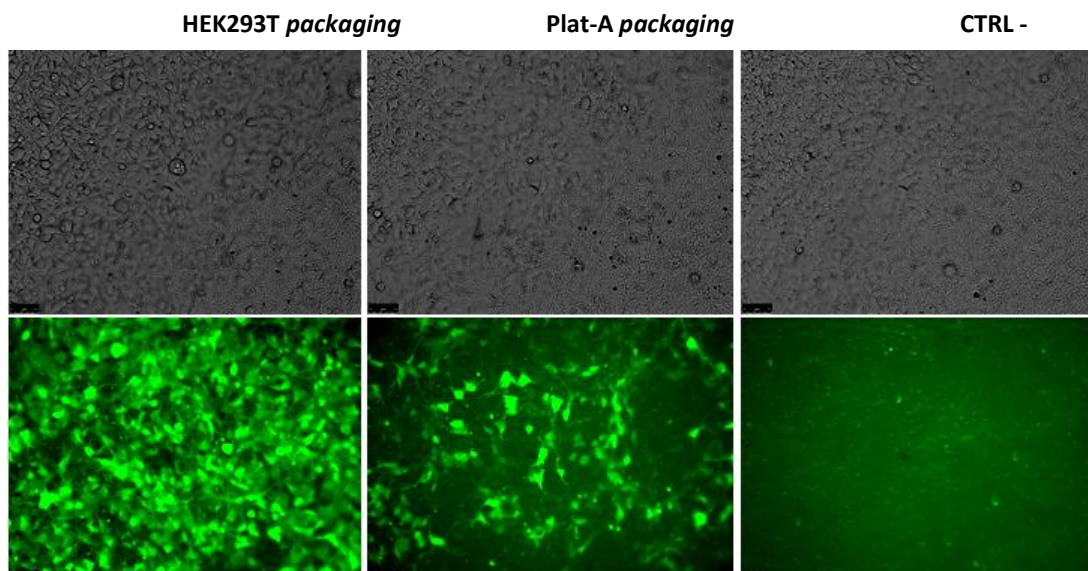


Figura 8: Osservazione al microscopio a fluorescenza dell'espressione della GFP in cellule HEK293A trasdotte con vettori retrovirali. La trasduzione con virioni provenienti da HEK293T risulta migliore rispetto a quella con virioni ottenuti dalle cellule PLAT-A. È evidente la differenza di fluorescenza rispetto al controllo negativo costituito dalle sole HEK293A.

10.2 CONFRONTO TRA SISTEMI DI TRASDUZIONE: TRASDUZIONE STATICA E SPIN-INOCULATION

Per riuscire a garantire la massima efficienza di produzione dei virioni retrovirali per ottenere alti titoli virali, sono stati condotti esperimenti di traduzioni con diverse modalità e ne è stata confrontata l'efficienza. Sono state trasdotte cellule MRC5 e HEK293A sia con modalità statica, che è quella più comunemente usata e che prevede la semplice aggiunta dei virioni al pozzetto di cellule, e con modalità *spin-inoculation*, che prevede una fase di centrifugazione per permettere ai virioni di penetrare meglio nelle cellule trasdotte. Grazie a questa procedura l'efficienza di trasduzione può aumentare dal 10% al 25%, in base alla velocità di centrifugazione (Wu Y.,W. Melton D., 2009). Le cellule MRC-5 e HEK293A sono state seminate su 2 differenti piastre da 6 pozzetti e infettate con i vettori retrovirali prodotti precedentemente. Per gli esperimenti in modalità *spin-inoculation*, le piastre da 6 pozzetti contenenti le cellule trasdotte sono state poste in centrifuga per 2 ore a 4°C a 3000 rpm.

Come si può notare dalla fig. 9, è evidente che la trasduzione con vettori retrovirali mediante *spin-inoculation* ha notevolmente incrementato l'efficienza

di trasduzione, e di conseguenza è possibile osservare una maggiore espressione della GFP in queste cellule rispetto a quelle trattate con il protocollo di trasduzione standard. Inoltre, è importante sottolineare che con il nuovo protocollo di trasduzione si è riuscito ad ottenere un alto livello di espressione della GFP, e quindi dell'integrazione dei vettori virali, anche nei fibroblasti umani (MRC5), che sono state le cellule utilizzate per la riprogrammazione ad iPSCs. La maggiore efficienza di trasduzione in modalità *spin-inoculation* però è risultata essere anche accompagnata da una maggiore sofferenza cellulare ed quindi stata diminuita la velocità di centrifugazione da 3000 a 1200 rpm, con un conseguente miglioramento della trasduzione.

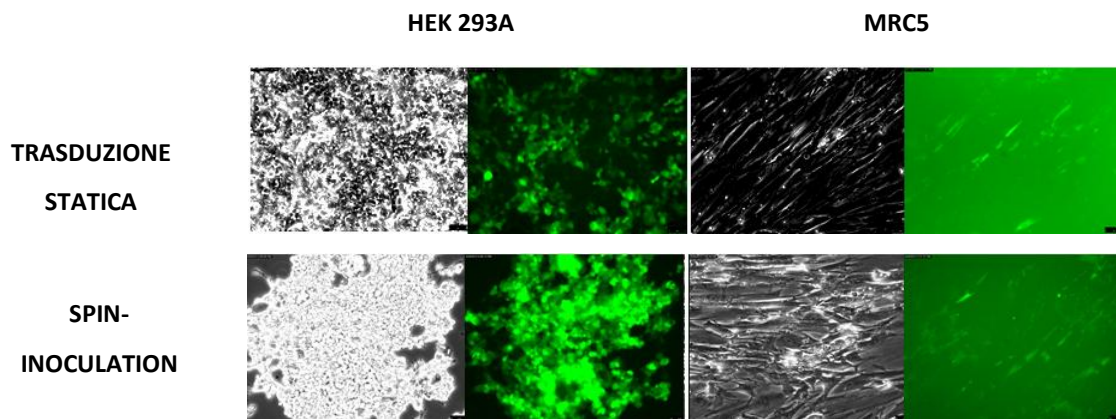


Figura 9: Esperimenti di trasduzione compiuti su cellule HEK 293T e MRC5. Entrambi i tipi di cellule sono stati trasdotti sia con la modalità statica (standard), sia con modalità spin-inoculation. E' evidente dall'immagine che la metodica della spin-inoculation fa aumentare notevolmente l'efficienza di trasduzione nelle cellule HEK 293A, ma soprattutto in fibroblasti umani (MRC5), che saranno le cellule utilizzate per la riprogrammazione.

10.3 SAGGIO DI INFETTIVITÀ DEI FIBROBLASTI UMANI

Per verificare l'efficienza di trasduzione dei singoli vettori virali sui fibroblasti umani, sono state effettuate prove di trasduzione utilizzando gli stock virali prodotti e infettando cellule HFF. L'efficienza di trasduzione è stata analizzata sia tramite analisi di microscopia a fluorescenza, per verificare l'espressione della GFP, sia con analisi citofluorimetrica. E' possibile osservare che tutti i vettori sono riusciti ad infettare con buona efficienza i fibroblasti umani. Inoltre, è possibile notare che il vettore retro virale, contenente il gene c-Myc, ha un'espressione molto maggiore rispetto agli altri e per questo motivo viene usato in quantità inferiori durante il protocollo di trasduzione (Fig. 10).

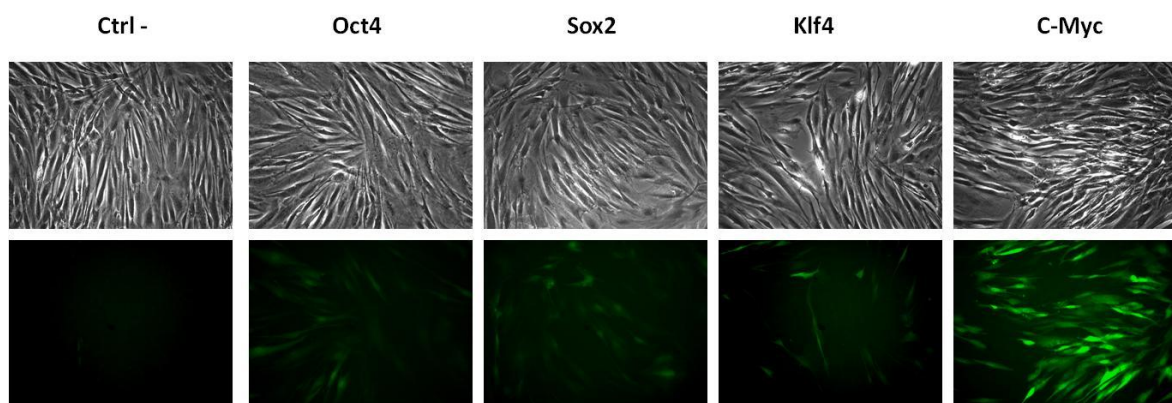


Figura 10: Trasduzione di cellule HFF con i singoli vettri retrovirali contenenti rispettivamente i geni umani Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc. Il controllo negativo non infettato è completamente privo di segnale fluorescente, mentre gli altri vettori risultano integrati con successo nelle cellule infettate ed esprimono la GFP. Il vettore contenente il gene c-Myc ha un'efficienza di trasduzione molto più alta rispetto agli altri vettori retrovirali.

Per stimare con più precisione l'efficienza di trasduzione di ciascuno stock virale, sono state effettuate alcune analisi citofluorimetriche sulle cellule trasdotte. Le cellule sono state selezionate in base alla loro morfologia e all'espressione del segnale fluorescente della GFP virale.

E' possibile notare in fig. 11 che i tassi di efficienza di trasduzione sono risultati elevati ed in particolare esprimono la GFP rispettivamente pMIG-hOct4 63%, pMIG-hSox2 73%, pMIG-Klf4 41% e pMIG-c-Myc il 53% delle cellule trasdotte.

Gli stock virali analizzati sono stati successivamente utilizzati per effettuare gli esperimenti di riprogrammazione su fibroblasti umani BJ trasducendo le cellule con tutti e 4 i vettori retrovirali per ottenere cloni iPSCs.

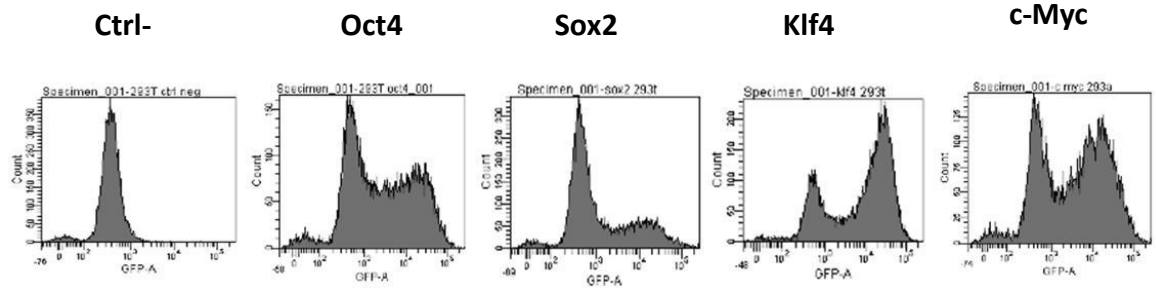


Figura 11 Analisi citofluorimetrica dell'efficienza di trasduzione dei vettori retrovirali pMIG utilizzati per la riprogrammazione. In particolare partendo da sinistra si hanno i risultati del controllo negativo, Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc.

Una caratteristica importante dei vettori retrovirali pMIG è la presenza del gene GFP a valle del gene di riprogrammazione che viene co-espresso con quest'ultimo grazie alla presenza dell'elemento IRES. Questo gene della GFP viene silenziato nelle cellule completamente riprogrammate, in quanto il promotore del vettore retrovirale integrato viene metilato. Questa particolare peculiarità facilita il controllo dell'efficienza di trasduzione nella prima parte del protocollo, ma allo stesso tempo permette di distinguere con sicurezza le colonie di iPSCs completamente riprogrammate rispetto a quelle che lo sono parzialmente, soltanto mediante osservazione al microscopio a fluorescenza. Dagli esperimenti di riprogrammazione effettuati utilizzando i vettori retrovirali, sono stati ottenuti 5 cloni di iPSC completamente riprogrammati.

E' possibile notare in Fig. 12 le colonie completamente riprogrammate in cui il segnale della GFP viene completamente perso e altre colonie parzialmente riprogrammate in cui è ancora evidente il segnale fluorescente.

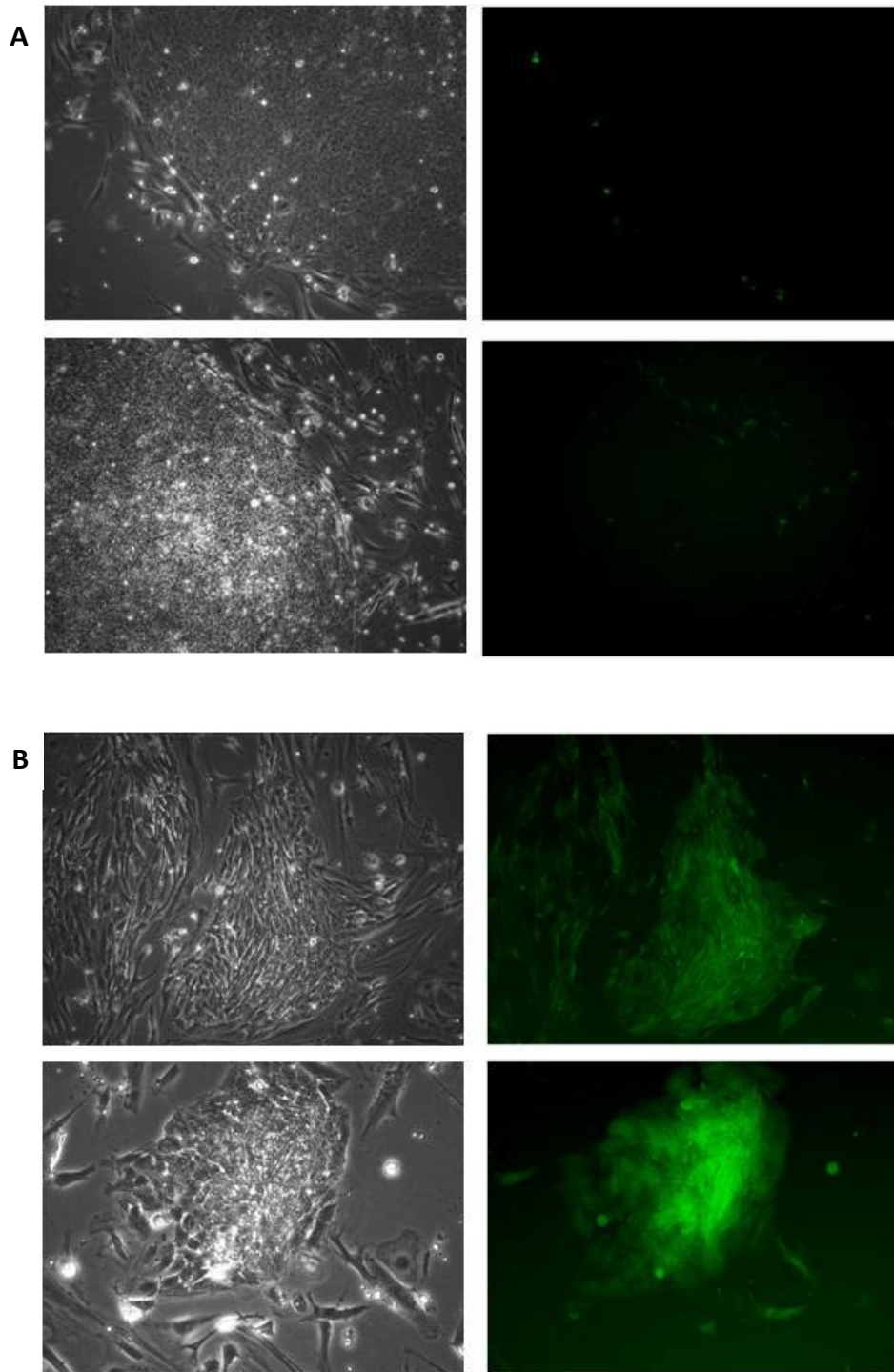


Figura 12 Analisi al microscopio a fluorescenza dei cloni iPS ottenuti mediante riprogrammazione con vettori retrovirali. A) I cloni completamente riprogrammati non mostrano espressione fluorescente della GFP poiché i transgeni esogeni introdotti con i vettori retrovirali sono stati silenziati completamente. B) I cloni iPS in cui è ancora espressa la GFP sono parzialmente riprogrammati poiché il silenziamento dei transgeni esogeni non è avvenuto completamente. Per questo motivo questi cloni devono essere eliminati.

11 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI DERIVATI DAL VIRUS DEL SENDAI

Per generare le cellule iPSCs a partire da fibroblasti umani BJ senza problemi di integrazione del genoma del vettore in quello cellulare sono stati usati vettori derivati dal virus del Sendai, in particolare è stato utilizzato il sistema CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, Life Technologies) che include 4 vettori virali contenenti i quattro fattori di Yamanaka (Oct3/4, Sox2, Klf4, e c-Myc).

Due giorni prima dell'infezione sono stati seminati i fibroblasti BJ. Già due giorni dopo l'infezione con tutti e quattro i vettori virali si è notato l'effetto citopatico che diventava sempre più evidente con il passare dei giorni. Dopo una settimana dalla trasduzione le cellule sono state staccate dalla piastra e seminate su un feeder layer di MEF e il terreno di coltura è stato sostituito con quello specifico per le cellule staminali e si cominciavano a vedere i primi cambiamenti morfologici. Già dall'undicesimo giorno post-infezione cominciavano ad emergere le prime piccolissime colonie. Al diciassettesimo giorno le colonie risultavano chiaramente visibili e dopo circa 10 giorno diventavano grandi a sufficienza per essere prelevate ed espanse (fig.13).

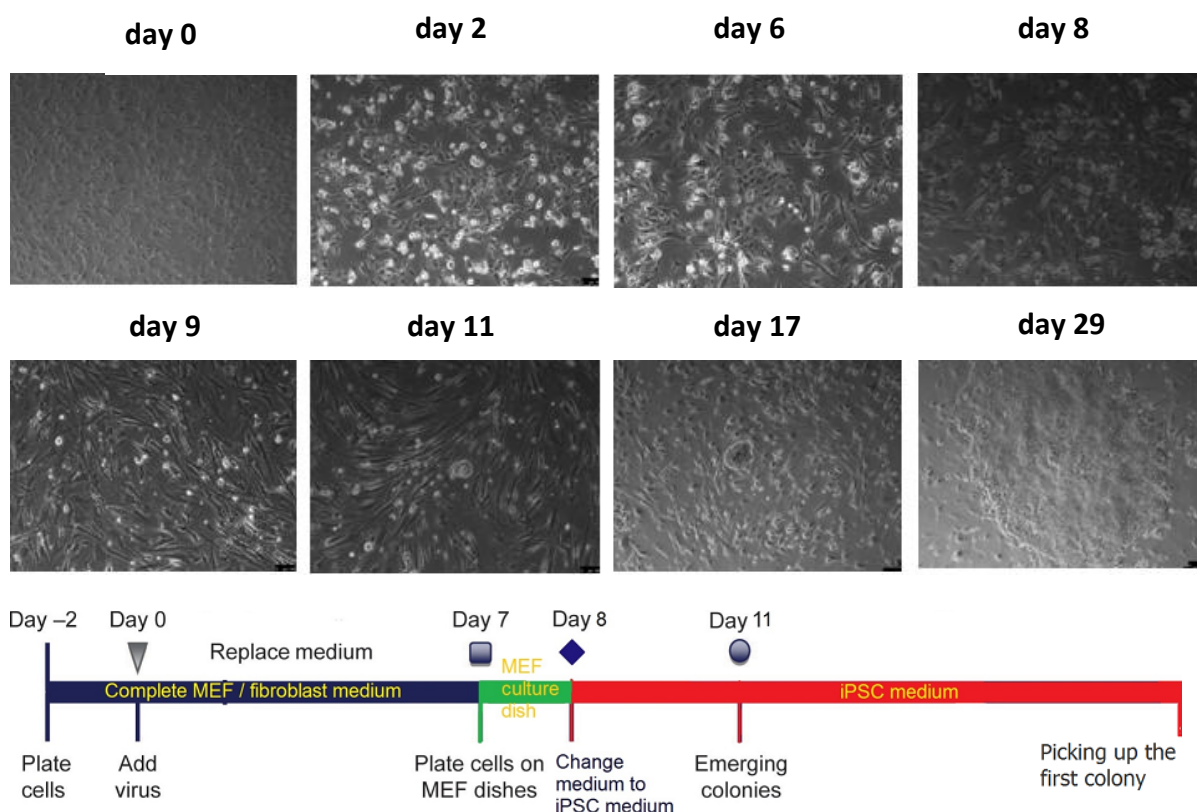


Figura 13 Questa immagine mostra le varie fasi di riprogrammazione con i vettori derivati dal virus del Sendai. Inizialmente è stato possibile osservare un forte effetto citopatico sulle cellule trasdotte. Successivamente, intorno all'ottavo giorno post-trasduzione, le cellule hanno cambiato la loro morfologia che cambia via via fino al diciassettesimo giorno dopo l'infezione in cui è possibile vedere le prime colonie emergere. Intorno al ventinovesimo giorno dopo l'infezione con i vettori dal Sendai virus, le colonie di iPSC sono sufficientemente grandi da permettere di prelevarle ed espanderle.

Utilizzando questo metodo di riprogrammazione sono stati ottenuti 11 cloni di iPSCs che sono stati espansi, poi congelati e due di questi sono stati successivamente caratterizzati. E' possibile notare che anche in questo caso le colonie generate presentavano le caratteristiche tipiche delle colonie iPSC, come la presenza di contorni ben definiti e una struttura interna compatta (Fig. 14). I cloni prodotti con i vettori derivati dal Sendai virus, tuttavia, impiegavano più tempo e più passaggi prima di assumere una ben definita morfologia rispetto a quelli generati con altri metodi di riprogrammazione.

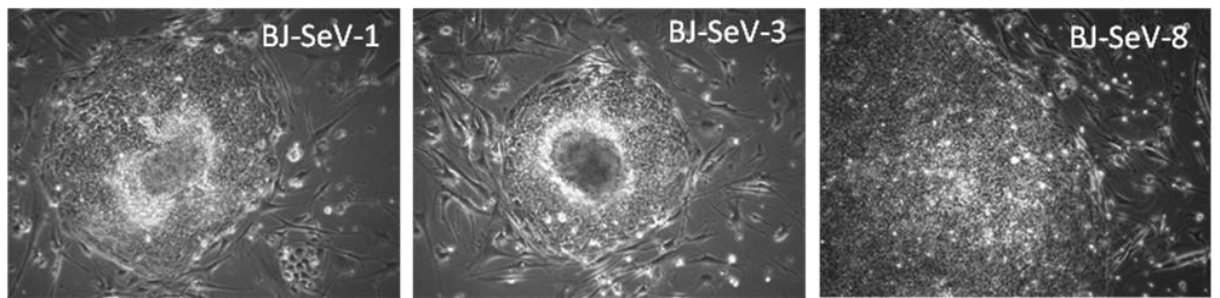


Figura 14 L'immagine mostra i cloni iPSC ottenuti tramite riprogrammazione con vettori derivati dal virus del Sendai. La morfologia dei cloni mostra dei contorni definiti, e le cellule pluripotenti hanno un aspetto compatto.

12 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI EPISOMALI

Per ovviare all'uso di vettori virali integrativi con i vettori retrovirali e lentivirali o dai costi elevati, come i vettori derivati dal virus Sendai, si è deciso di mettere a punto un protocollo di riprogrammazione mediante l'uso dei vettori episomali pCXLE.

Sono stati utilizzati 3 plasmidi pCXLE contenenti rispettivamente i geni umani Oct4, Sox2 e Klf4 e L-Myc. Dato che i fibroblasti, specialmente quelli umani, sono molto difficili da trasfettare, per rendere la trasfezione efficiente è stato utilizzato lo strumento nucleofector (Lonza) che permette al plasmide di entrare direttamente nel nucleo della cellula.

Inizialmente è stato utilizzato un kit di ottimizzazione per identificare il programma di trasfezione più efficiente e meno citotossico. Dalla fig. 15 è possibile osservare che alcune condizioni portavano alta efficienza di trasfezione, ma anche un altro tasso di citotossicità e altre che non dimostravano alta efficienza di trasduzione. Per questo motivo è stata scelta la condizione che presentava la miglior efficienza di trasfezione associata ad una minor mortalità cellulare.

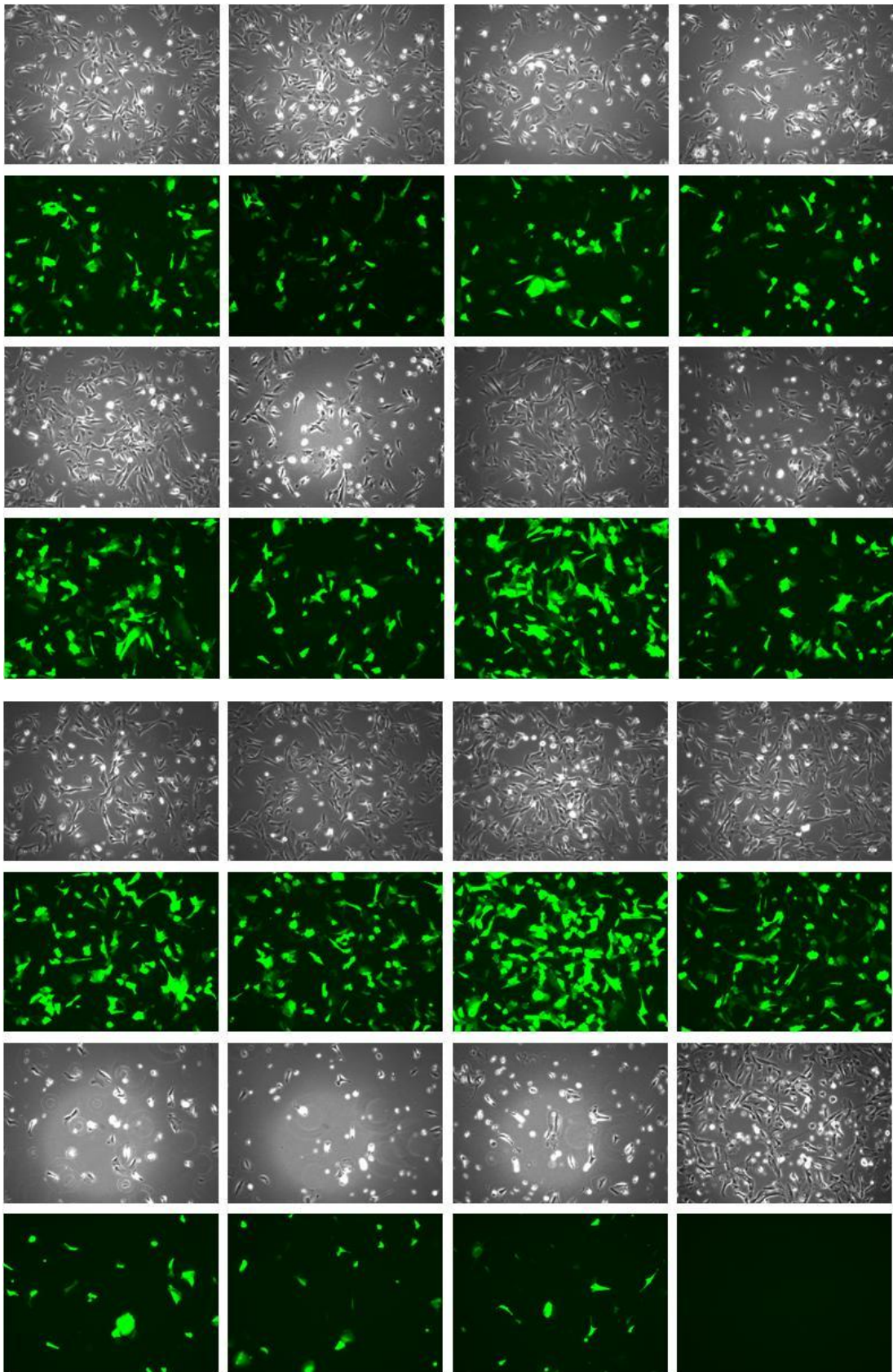


Figura 15 Ottimizzazione dei protocolli di nucleofezione su fibroblasti BJ. Le immagini mostrano condizioni in cui la nucleofezione con il vettore di controllo GFP ha prodotto un effetto citopatico notevole ed altre in cui non si nota un segnale GFP molto forte. La condizione ideale è quella in cui si ottiene un'ottima efficienza di trasduzione non accompagnata però da un forte effetto citopatico.

Dopo aver trovato la condizione di trasfezione migliore, i fibroblasti BJ sono stati nucleofettati con tutti e tre i vettori episomali pCXLE. Già un giorno dopo la trasfezione, era visibile il segnale fluorescente della GFP del vettore di controllo co-trasfettato con i vettori episomali e 5 giorni dopo la nucleofezione, era osservabile un netto aumento dell'espressione del transgene (Fig. 16).

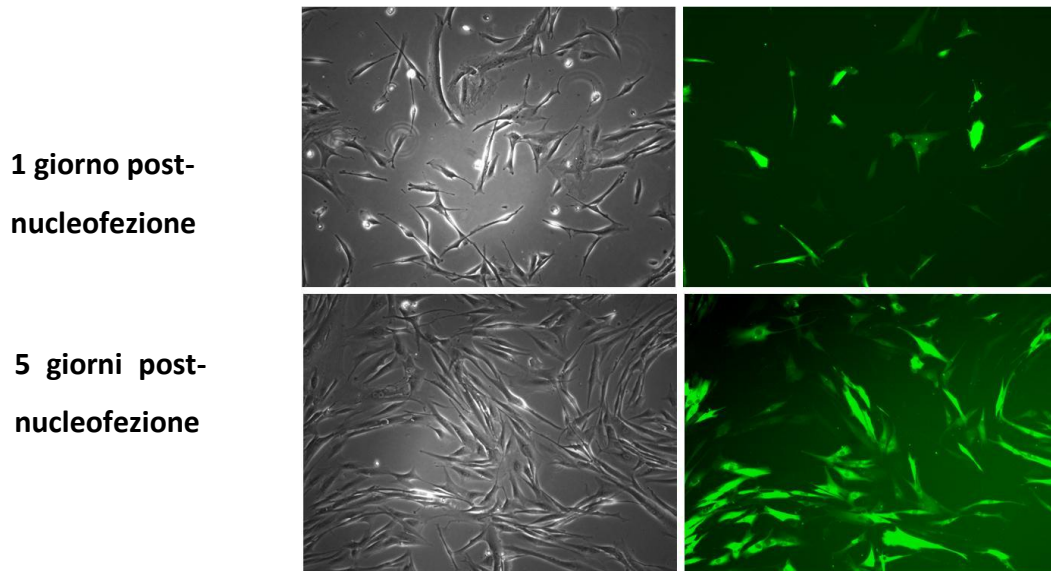


Figure 16 Espressione del segnale fluorescente della protein GFP presente nel vettore di controllo dopo nucleofezione di fibroblasti BJ. E' possibile notare che già dopo un giorno dal protocollo di nucleofezione, con i vettori episomali e con quello di controllo, è presente il segnale fluorescente. Dopo 5 giorni dalla nucleofezione il segnale della GFP aumenta notevolmente rilevando un'ottima efficienza di trasduzione e di espressione dei geni enfidogeni.

Sette giorni dopo la nucleofezione con i vettori episomali le cellule sono state staccate dalla piastra e trasferite sul un feeder layer di fibroblasti murini irradiati (MEF) e si è cominciato a coltivare le cellule in terreno specifico per le cellule staminali in modo da favorirne la riprogrammazione grazie al fattore di crescita *fibroblast growth factor* (FGF) e ai fattori secreti dai MEF. Dopo circa 25 giorni le colonie di iPSCs erano sufficientemente grandi per essere prelevate, espanse e poi congelate per la successiva caratterizzazione.

Sono stati ottenuti con questo metodo 14 cloni di iPSCs che presentavano bordi definiti e le cellule risultavano molto compatte con i nucleoli ben evidenti (Fig. 17). Due cloni sono stati poi caratterizzati.

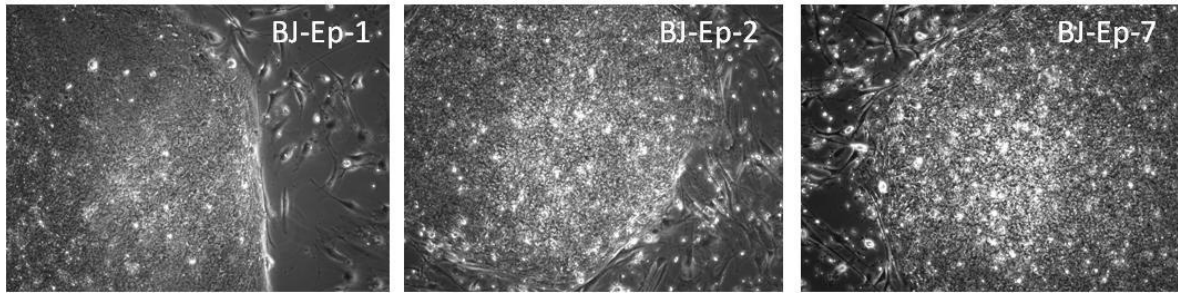


Figure 17 L'immagine mostra i cloni iPSC ottenuti mediante riprogrammazione con vettori episomali. I contorni delle colonie risultano ben definiti, le cellule che la compongono sono compatte e sono ben visibili i nucleoli.

13 RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI ADENOVIRALI

13.1 PRODUZIONE DI VETTORI ADENOVIRALI PER LA GENERAZIONE DI IPSC

I vettori adenovirali possono rappresentare un sistema alternativo ai vettori episomali, con il vantaggio di avere un'elevata efficienza di trasduzione, oltre a bassi costi di produzione e al fatto di non essere integrativi. In letteratura sono stati riportati solo pochissimi esempi di riprogrammazione a cellule iPSC con questo metodo utilizzando geni umani (Stadtfeld M. et al, 2008; Zhou W. et al, 2009).

Per questo motivo sono stati generati vettori adenovirali veicolanti i quattro fattori di riprogrammazione. Per la produzione dei vettori adenovirali ricombinanti, le cellule HEK 293A sono state trasfettate con i tre vettori linearizzati contenenti rispettivamente i geni Oct4, Sox2 e Klf4 e c-Myc. Il terreno è stato poi ripristinato e le cellule sono state incubate a 37°C fino alla comparsa dell'effetto citopatico (Fig. 18). A questo punto il sovrantante, contenente le particelle virali, è stato raccolto e titolato mediante la metodica del TCID₅₀ (Fig. 19) valutando la presenza di placche sulle cellule infettate.

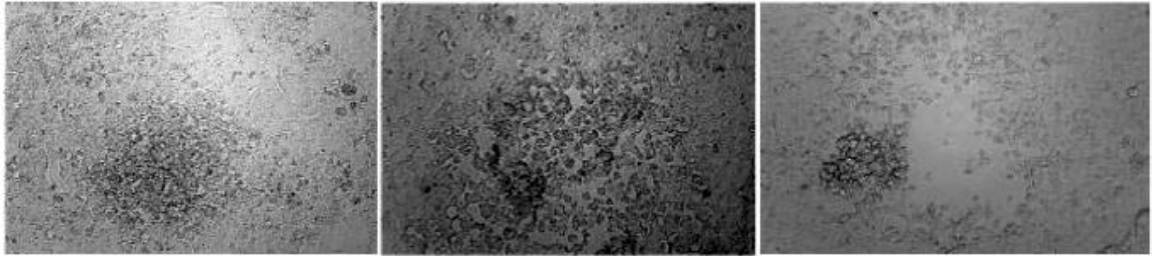


Figura 18 L'immagine mostra l'effetto citopatico prodotto dai vettori adenovirali sulle cellule HEK 293A. Le cellule di packaging subiscono un forte effetto citopatico dopo la trasfezione con i vettori adenovirali, poiché la formazione delle particelle di virus adenovirale ricombinante provoca tossicità alle cellule HEK 293A provocando placche nel monostrato cellulare.

	TCID ₅₀ Ad-Klf4 p.2										CTRL	
-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
-7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
-8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
-9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

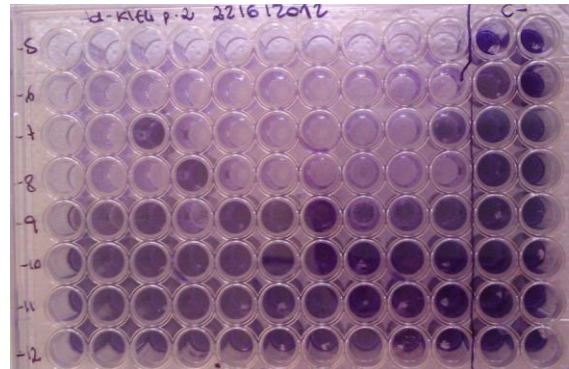


Figura 19 Esempio di titolazione TCID₅₀ del vettore pAd-Klf4. A sinistra è rappresentato lo schema della piastra di titolazione, mentre a destra è possibile notare la piastra utilizzata per la titolazione in cui le cellule sono state fissate e colorate con cristal.violetto per evidenziare le placche. I simboli + rappresentano i pozzetti in cui sono presenti le placche prodotte dal virus adenovirale. I numeri a sinistra della piastra mostrano i logaritmi delle diluizioni del titolo virale.

13.2 IMMUNOFLUORESCENZA

Per valutare l'efficienza di trasduzione dei nuovi vettori adenovirali, sono state compiute alcune prove di immunofluorescenza per identificare i transgeni espressi nelle cellule BNL infettate con diverse MOI di vettore adenovirale. E' possibile notare dalla fig. 20 che a MOI 20 l'espressione di Oct4 era quasi assente, mentre a MOI 500 si osservava un elevato segnale fluorescente associato però a citotossicità. Per questo motivo si è deciso di testare tutti i vettori adenovirali con MOI comprese tra 200 e 500

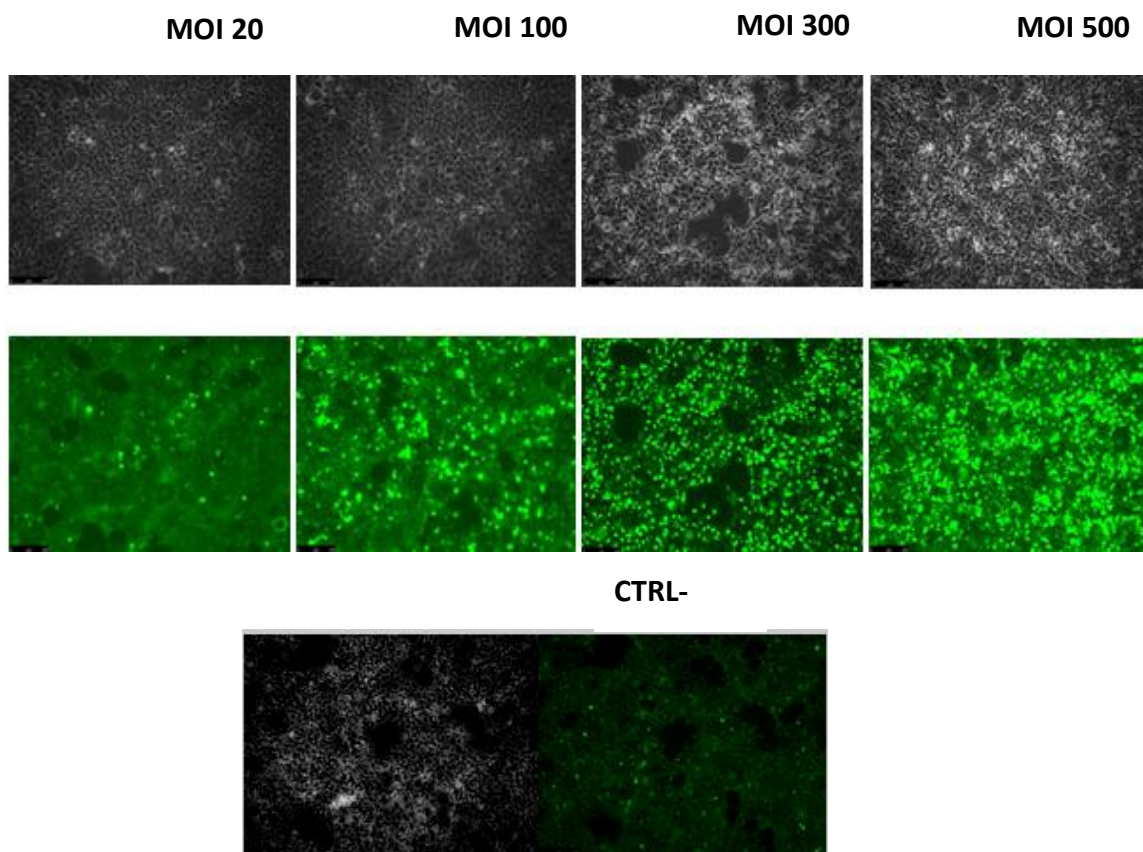


Figura 20 La figura mostra l'analisi di immunofluorescenza eseguita su cellule HEK 293A infettate con il virus adenovirale ricombinante Ad-Oct4 a diverse concentrazioni di titolo virale (MOI), in particolare MOI 20, 100, 300 e 500. Si può notare che a MOI 20 non si ha una buona espressione del transgene, mentre all'aumentare della MOI aumenta proporzionalmente anche il segnale FITC. Tuttavia si può notare che l'alta concentrazione virale è associata a citotossicità. Sono infatti evidenti delle placche nelle cellule infettate con MOI 300.

Successivamente, per verificare l'espressione di tutti i fattori di riprogrammazione mediante immunofluorescenza, i fibroblasti umani HFF sono stati trasdotti con due concentrazioni virali: MOI 200 e 500. Osservando la figura 21 si nota che a MOI 500 si ha un'ottima espressione di tutti i geni, ma è anche molto evidente l'effetto citopatico prodotto, soprattutto nelle cellule infettate con c-Myc.

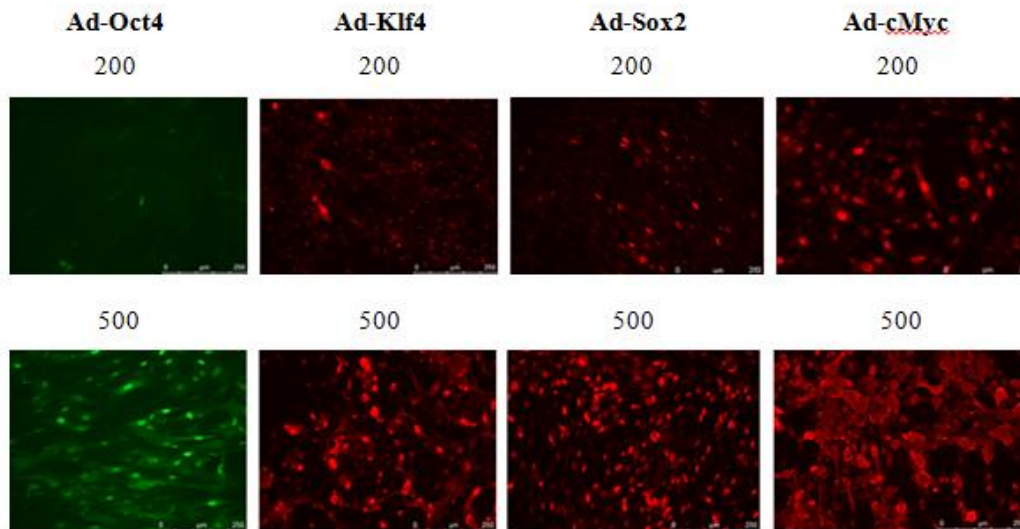


Figura 21 Analisi di immunofluorescenza su fibroblasti HFF infettati con tutti e 3 i vettori adenovirali ricombinanti (pAd-Oct4, pAd-Sox2-Klf4 e pAd-C-Myc) con due differenti MOI (200 e 500). E' possibile notare l'espressione dei transgeni in tutte le cellule infettate. In particolare a MOI 500 si ha un'espressione dei transgeni molto alta ma anche correlata ad un'alta citotossicità.

Sono stati inoltre trasdotti dei fibroblasti BJ con tutti e tre i vettori adenovirali contemporaneamente ad una MOI totale di 150 e 300 (Fig. 22), ma persisteva l'effetto citopatico.

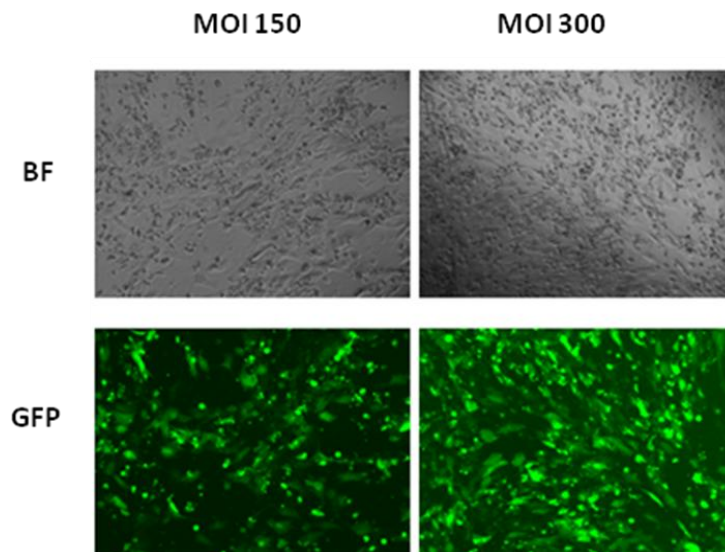


Figura 22 Trasduzione di fibroblasti BJ con tutti e tre i vettori adenovirali insieme. A MOI 300 si ha molta citotossicità cellulare ma anche un'espressione dei transgeni molto alta.

Per questi motivi, i successivi esperimenti di trasduzione sono stati compiuti utilizzando MOI molto più basse, ma ripetute nel tempo (Fig. 23), con l'obiettivo di ridurre la citotossicità e mantenere alta l'espressione dei geni di riprogrammazione, soprattutto nel periodo iniziale quando questo risulta molto importante.

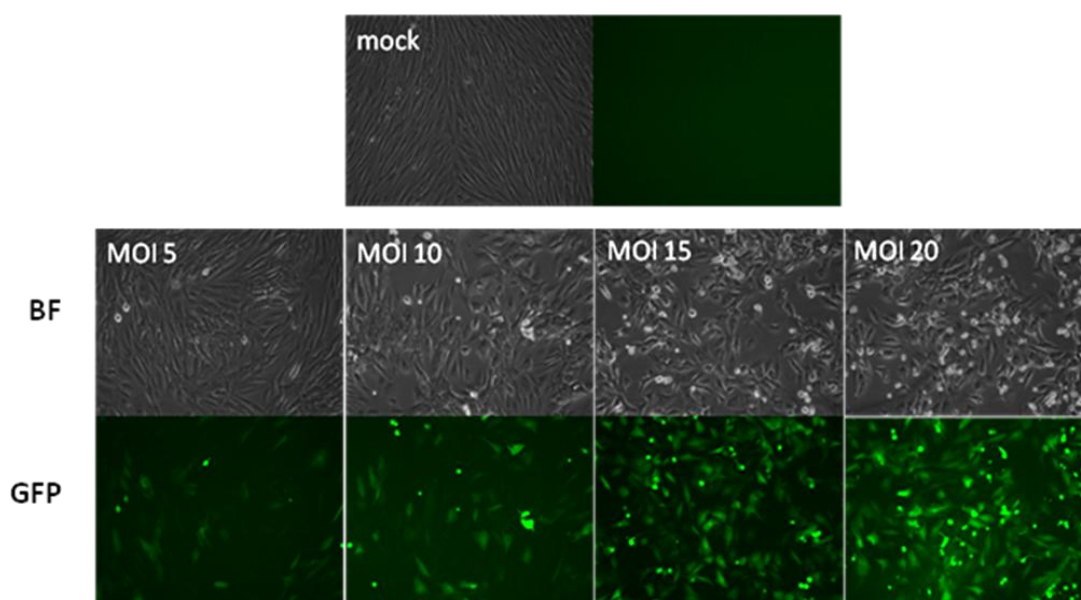


Figura 23 Trasduzione di fibroblasti BJ con tutti e tre i vettori adenovirali ricombinati a MOI molto basse (5, 10, 15, 20). Anche con bassa concentrazione virale si ottiene una buona efficienza di trasduzione. Questo è un buon sistema se ripetuto per più volte sulle stesse cellule infettate.

13.3 MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO DI RIPROGRAMMAZIONE CON VETTORI ADENOVIRALI

Per il protocollo di riprogrammazione è stata seguita la strategia delle trasduzioni ripetute a bassa MOI. Tuttavia, sono stati riscontrati diversi problemi nel trasdurre i fibroblasti per lungo tempo senza mai staccarli dalla piastra, perché tendono a formare giunzioni molto forti tra cellula e cellula e ciò rende difficile disgregarle per poterle mettere sul feeder layer. Questo non rende possibile la riprogrammazione.

Perciò i fibroblasti BJ sono stati seminati direttamente sul feeder layer di matrigel e sono state compiute quindi 6 trasduzioni consecutive ad una MOI totale di 30 e successivamente il terreno è stato sostituito con il terreno specifico

per le cellule staminali. Circa 25 giorni dopo sono stati riscontrati cambiamenti morfologici nelle cellule trasdotte (Fig 24), ma senza ottenere colonie di iPSCs completamente riprogrammate.

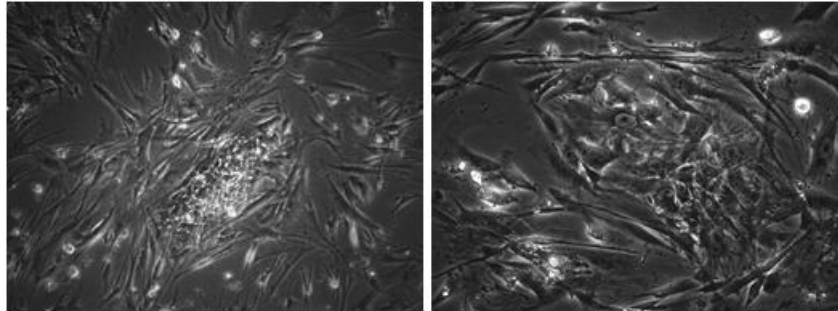


Figura 24 Quest'immagine rappresenta i cambiamenti morfologici subiti dai fibroblasti BJ sottoposti a protocollo di riprogrammazione con vettori adenovirali per circa un mese. E' possibile notare lo sviluppo di aggregati cellulari simili a colonie di cellule iPSC. Le cellule facenti parte degli aggregati non posseggono più la classica morfologia del fibroblasti, ma presentano caratteristiche diverse.

14 CARATTERIZZAZIONE CLONI iPSC

14.1 TEST DELLA FOSFATASI ALCALINA

Il test della fosfatasi alcalina è il primo livello di caratterizzazione che usualmente viene eseguito per capire se le cellule sono pluripotenti o meno. Questo test è stato eseguito su cellule iPSC non fissate generate con tutti e tre i protocolli di riprogrammazione. Il marcatore fluorescente marca le cellule pluripotenti senza interferire sulla vitalità cellulare.

La fig. 25 dimostra che tutti e tre i protocolli hanno generato cloni di iPSC formati da cellule pluripotenti poiché tutti esprimono il segnale fluorescente FITC.

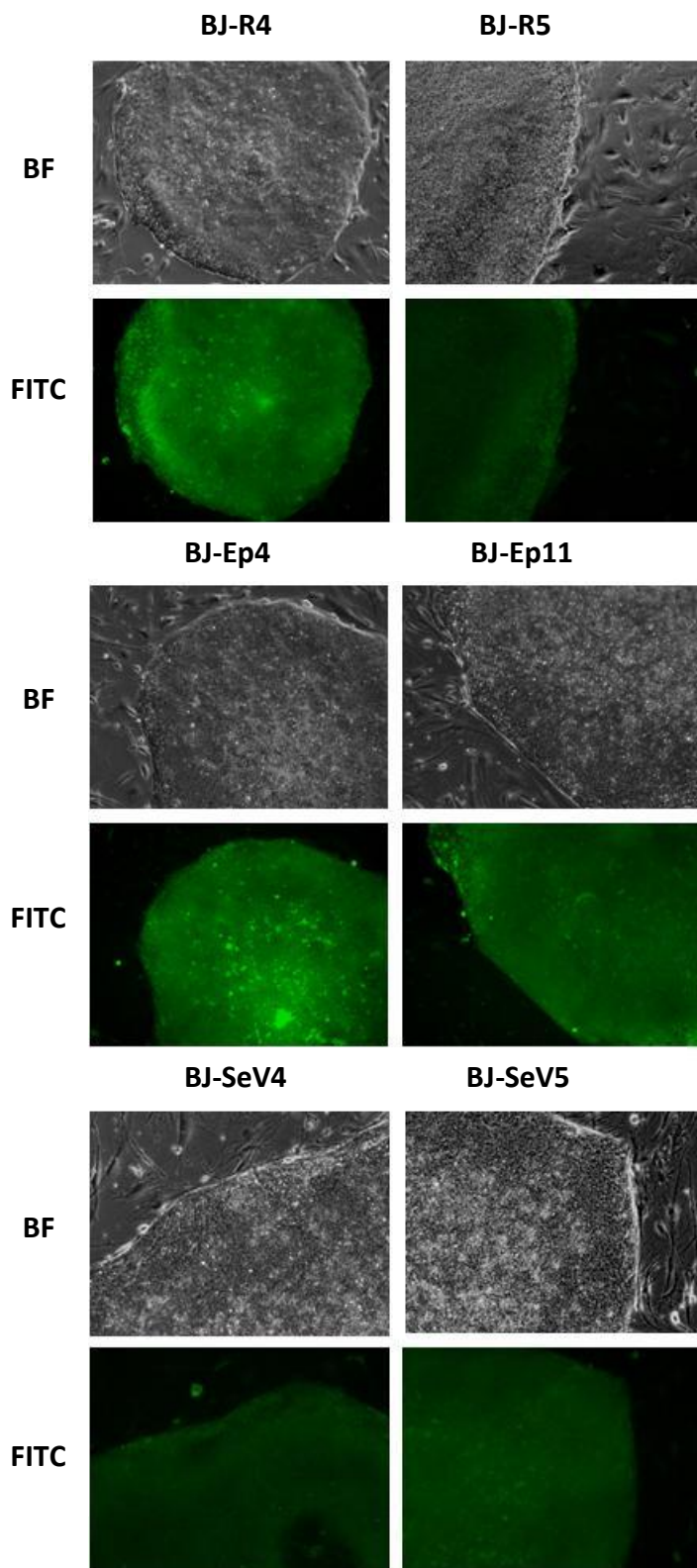


Figura 25 Test della fosfatasi alcalina. L'immagine rappresenta il risultato del test della fosfatasi alcalina a cui sono stati sottoposti i cloni iPS ottenuti mediante riprogrammazione con vettori retrovirali, vettori derivati dai virus del Sendai e da vettori episomali. E' possibile notare che tutti i cloni esprimevano il segnale FITC poiché tutti erano composti da cellule pluripotenti.

14.2 IMMUNOFLUORESCENZA SUI MARCATORI DI PLURIPOTENZA

La seconda analisi che è stata compiuta per caratterizzare la pluripotenza dei cloni generati è stata l'immunofluorescenza. Sono stati analizzati i tipici marcatori di pluripotenza espressi dalle cellule staminali embrionali. Osservando la Fig. 26 è possibile notare che tutti i cloni ottenuti con tutti i metodi di riprogrammazione esprimono i marcatori di pluripotenza Oct4, Tra 1-60, SSEA4, SSEA3 e Nanog.

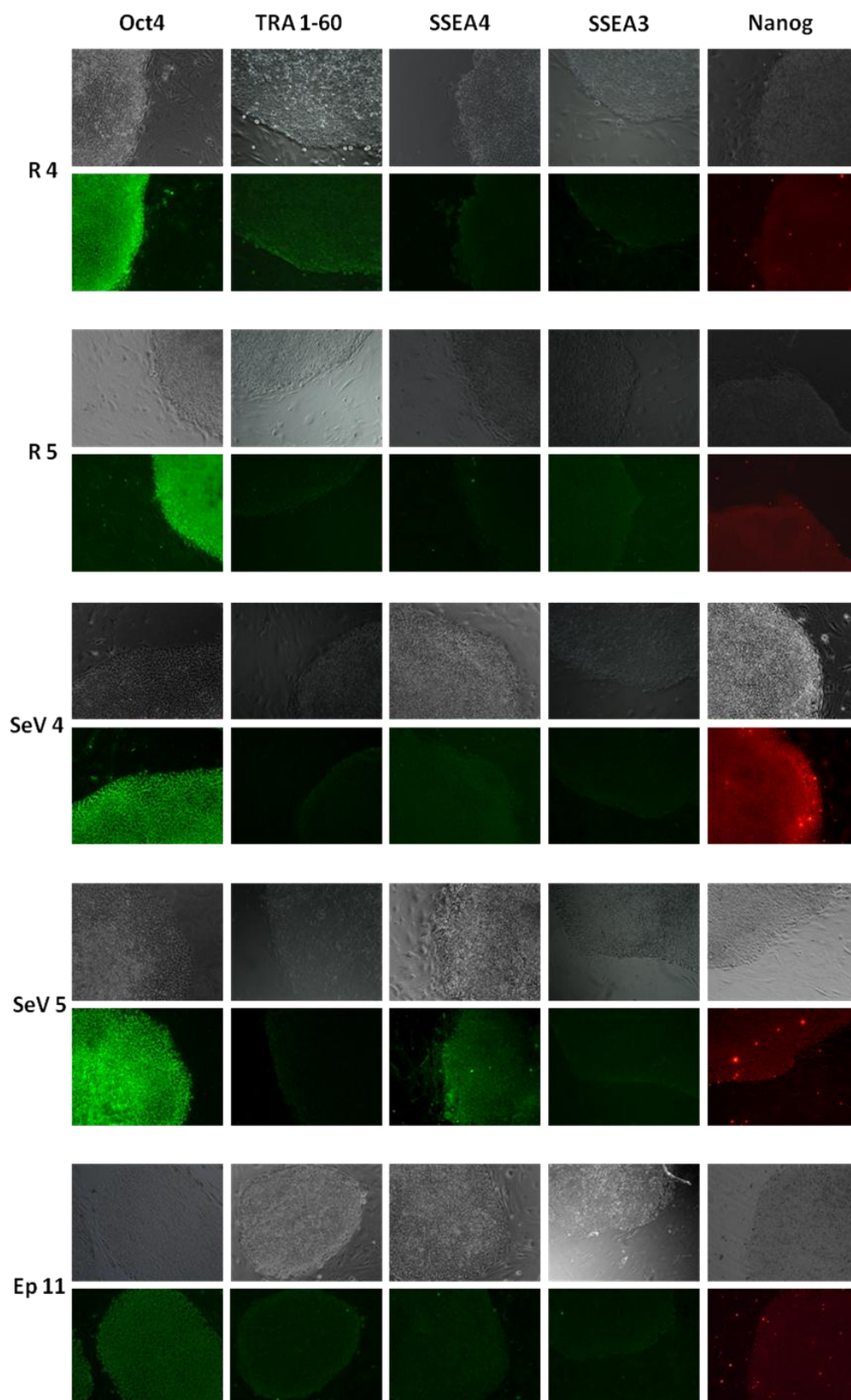


Figura 26 Analisi di immufluorescenza sui marcatori di pluripotenza (Oct4, TRA 1-60, SSEA3, SSEA4, Nanog) su cloni iPS derivati con vettori retrovirali (R), con vettori derivati dal virus del Sendai (SeV) e con vettori episomali (Ep). Tutti i cloni esprimono tutti i marcatori di pluripotenza.

14.3 ESPRESSIONE DEI TRASCRITTI DEI MARCATORI DEI GENI DELLA PLURIPOTENZA

Dopo l'analisi mediante immunofluorescenza, i risultati sono stati confermati grazie ad uno screening di espressione dei geni della staminalità compiuto sui cloni tramite PCR. Sono stati esaminati i seguenti geni della staminalità Oct4, Sox2, Rex1, Nanog, hTert, dmt3b e l'actina come gene *housekeeping*.

Anche in questo caso tutti i cloni esprimono i fattori di staminalità tipici delle cellule staminali embrionali (Fig. 27).

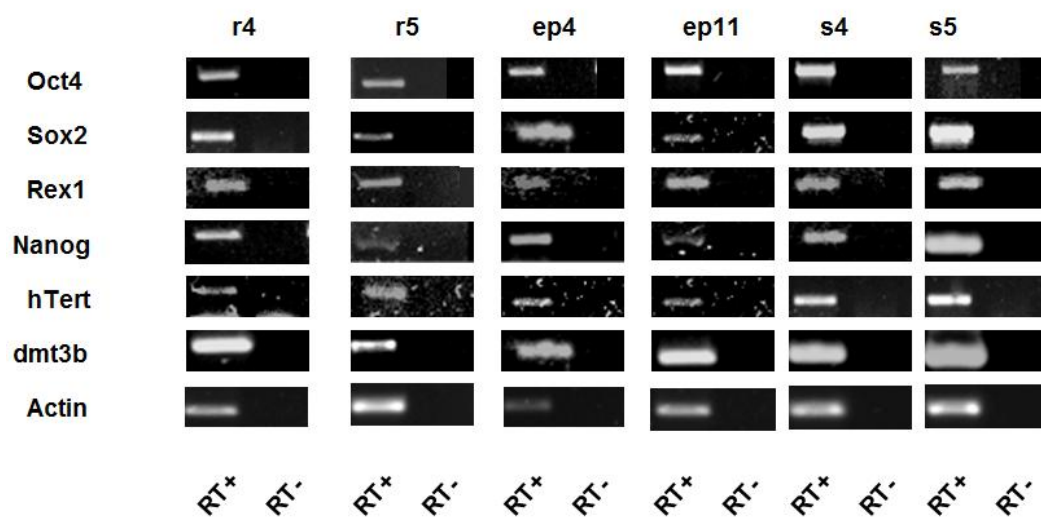


Figura 27 RT-PCR sui marcatori dei geni della pluripotenza. Su tutti i cloni caratterizzati è stata compiuta un'analisi di espressione di tutto un pannello di marcatori di pluripotenza. Tutti i cloni iPS hanno espresso tutti i geni analizzati e l'actina come gene *housekeeping*. Tutti i cloni iPS sono composti da cellule pluripotenti.

14.4 TEST DEGLI EMBRYOID BODIES

Questo test ha permesso di confermare la pluripotenza delle colonie di iPSCs ottenute dopo riprogrammazione con vettori retrovirali, vettori derivati dal Sendai-virus e vettori episomali. Questo test può essere sostituito alla formazione di teratoma in topi immunosoppressi o immunocompromessi. Le iPSCs sono state prima fatte crescere in sospensione e in forma di corpi embrioidi (EBs) su supporti ultra low attachment, con terreno specifico per le iPSCs privato del fattore di crescita b-FGF (basic fibroblast growth factor) così da permettere la differenziazione cellulare.

Dopo 7 giorni di crescita in sospensione gli EBs sono stati seminati su un supporto di gelatina nel quale hanno iniziato a crescere in adesione (Fig. 28). Trascorsi 15 giorni dall'inizio del test le cellule sono state trattate con tripsina e staccate dal supporto, quindi ne è stato estratto l'RNA che in seguito è stato retrotrascritto a cDNA. Le PCR sono state infine effettuate per amplificare i marcatori dei tre foglietti embrionali endoderma (AFP, GATA4), mesoderma (Flk1, Ve-Chaderin, Pecam) ed ectoderma (PAX6, β -tubulin). Come si può notare dalla fig. 29, l'analisi ha dimostrato l'espressione di tutti i marcatori dei tre foglietti germinativi decretando quindi la pluripotenzialità delle iPSCs derivate. Le iPSCs sono perciò in grado di differenziare e ricreare tutti i tessuti che fanno parte dell'organismo.

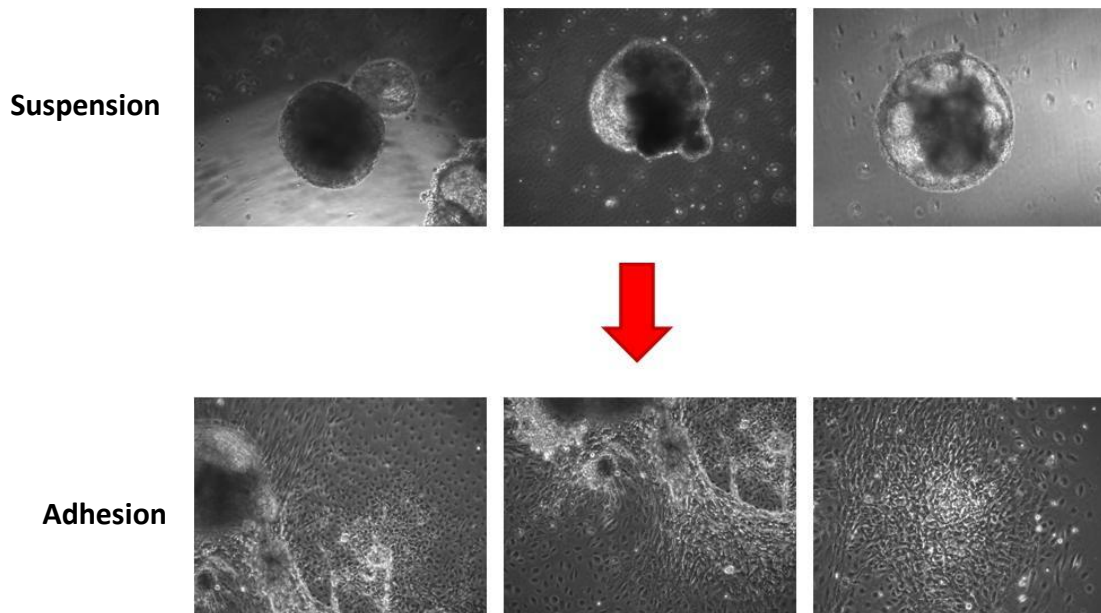


Figura 28 L'immagine in alto mostra i corpi embrioidi ottenuti mediante differenziamento in sospensione delle cellule iPS. E' possibile notare che all'interno delle sfere di cellule vi sono estroflessioni, poiché il corpo embrioidale tende a ricapitolare lo sviluppo embrionale nei tre foglietti germinativi. Successivamente i corpi embrioidi sono stati coltivati in adesione e dalle foto in basso è possibile osservare gli innumerevoli tipi cellulari, con morfologie molto diverse, appartenenti a tutti e tre i foglietti germinativi.

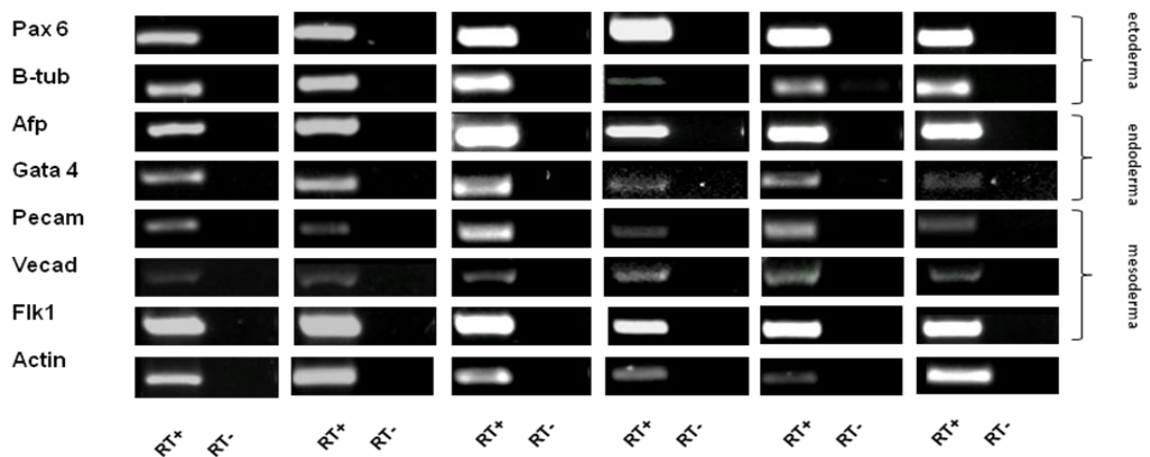


Figura 29 Pannello di espressione dei geni del differenziamento. Dagli EBs derivati da tutti i cloni iPS caratterizzati, è stato estratto il DNA ed è stata compiuta un'analisi mediante PCR per verificare la capacità delle iPSCs ottenute di derivare cellule da tutti i tre foglietti germinativi. E' possibile osservare che tutti i cloni sono stati in grado di ricreare i tre foglietti germinativi (ectoderma, endoderma e mesoderma).

15 DIFFERENZIAMENTO IPSCS IN MEGACARIOCITI

Una volta caratterizzati i cloni e quindi dopo aver confermato la staminalità e pluripotenza delle cellule iPS derivate, si è voluto differenziarle. E' stato applicato alle cellule iPS il protocollo di differenziamento in megacariociti che normalmente viene usato sulle cellule staminali ematopoietiche.

Le cellule iPS sono state seminate non in colonie ma in cellule singole in modo da ottenere un monostrato omogeneo. Già dopo il primo giorno di trattamento è stato possibile notare che le cellule cominciano a cambiare morfologia e a staccarsi dal monostrato andando in sospensione (Fig. 30A). Dopo 7 giorni dall'inizio del protocollo di differenziamento le cellule apparivano con una morfologia completamente diversa, ricca di membrane e protrusioni tipiche delle pro-piastrine (Fig. 30B).

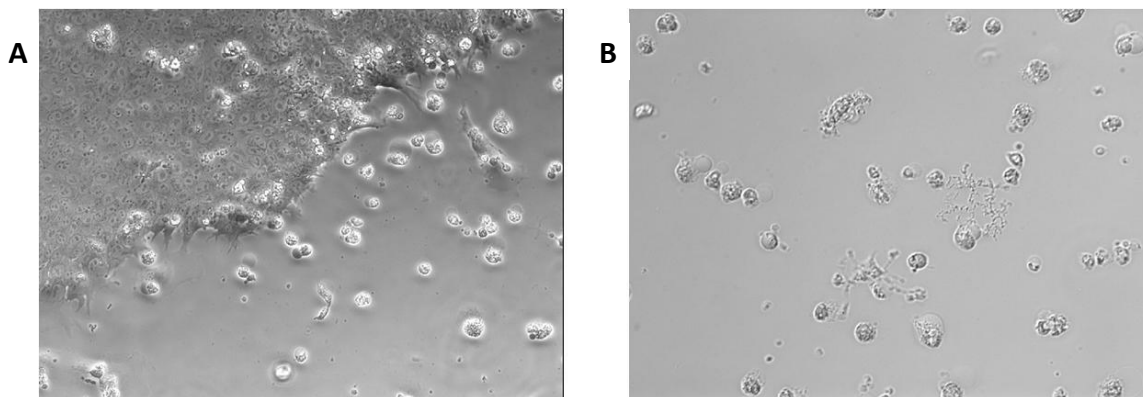


Figura 10 Differenziamento di cellule iPS in megacariociti. A) Dopo soltanto un giorno di differenziamento le cellule iPS cominciano a staccarsi dal monostrato per stare in sospensione. B) Dopo 7 giorni dall'inizio del differenziamento, le cellule presentano un cambio morfologico, presentano estroflessioni ramificate sulla superficie cellulare e appaiono di dimensioni maggiori rispetto alle cellule iPS di partenza. In questa immagine è possibile apprezzare cellule in vari stadi di maturazione.

Evidenziando i nuclei con un intercalante fluorescente, le cellule in differenziamento apparivano multinucleate, caratteristica è tipica dei megacariociti (Fig. 31A). Un'altra caratteristica tipica dei megacariociti, che è stata riscontrata nelle iPS differenziate, è la formazione di filamenti ramificati e il rilascio nel citoplasma di particelle anucleate simili a piastrine (Fig. 31B). A

differenza dei megacariociti però, le iPS trattate con il protocollo di differenziamento rimanevano piuttosto piccole anche se multinucleate, mentre i megacariociti aumentano moltissimo il proprio volume producendo molta membrana cellulare e molti nuclei.

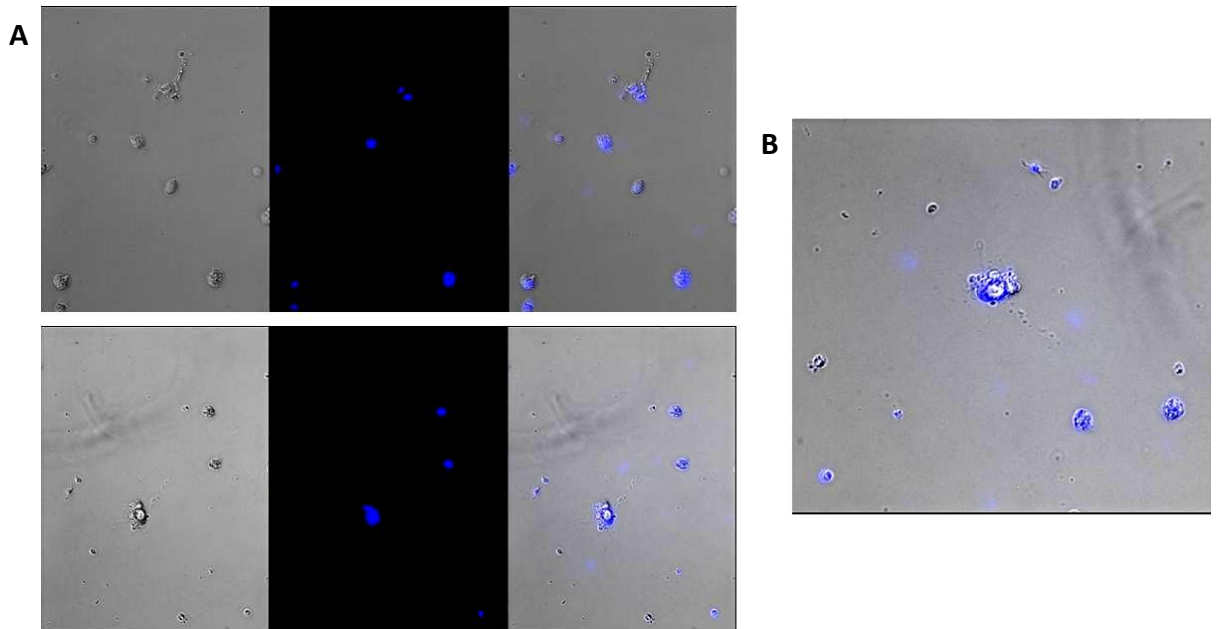


Figura 11 Mediante colorazione nucleare è possibile apprezzare la struttura polinucleata delle cellule iPS differenziate in megacariociti. (A). La foto B immortalata il momento in cui una cellula terminalmente differenziata, multi nucleata sta creando nuova membrana sulla sua superficie e sta rilasciando, nel terreno di coltura circostante, cellule anucleate molto simili a piastrine.

DISCUSSIONE

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) rappresentano uno strumento molto importante e interessante per lo sviluppo della medicina personalizzata nell'ambito della medicina rigenerativa; per lo studio della patogenesi di alcune malattie umane che possono essere geneticamente e fenotipicamente riprodotte in animali trasgenici; per lo screening di farmaci e per lo sviluppo della terapia cellulare e genica. In questo contesto, il differenziamento di iPSC in megacariociti, in grado di produrre piastrine funzionali, potrebbe rappresentare un valido strumento per sopperire alla continua richiesta piastrinica per la terapia di trombocitopenie genetiche o acquisite.

In questo studio sono state messe a punto diverse metodiche di riprogrammazione basate sull'uso di vettori virali, non virali, integranti o meno, per derivare iPSC da fibroblasti umani. Sono stati caratterizzati i cloni generati con i diversi protocolli per verificare che le cellule derivate fossero effettivamente staminali pluripotenti e che esprimessero le caratteristiche tipiche delle cellule staminali embrionali. Infine si è applicato per la prima volta un protocollo di differenziamento diretto delle cellule iPSC, ottenute attraverso riprogrammazione con vettori episomali, al fine di ottenere megacariociti maturi. Ottimizzando i diversi protocolli di riprogrammazione è stato possibile ottenere cloni di iPSCs sia mediante vettori retrovirali, seguendo il protocollo originale di Yamanaka (Yamanaka S. et al. 2007), sia utilizzando vettori derivati dal virus del Sendai (SeV) e vettori episomali.

Dai risultati ottenuti è stato possibile dimostrare che attraverso l'uso dei vettori episomali è stato possibile ottenere un numero più elevato di cloni di iPSC rispetto a quelli ottenuti con l'uso dei SeV o dei vettori retrovirali. La riprogrammazione mediante vettori episomali rappresenta quindi un metodo molto efficiente ed economicamente vantaggioso rispetto all'uso dei SeV contenuti nel kit commerciale CytoTune kit (Life Technologies) e con un rischio molto ridotto di mutagenesi inserzionale, in quanto utilizza vettori non integranti.

Tutti i cloni iPS caratterizzati esprimevano marcatori di superficie, epitopi e proteoglicani, tipicamente espressi dalle cellule staminali embrionali, come gli antigeni specifici dello stato embrionale (SSEA) 3 e 4 e l'antigene TRA 1-60 che identificano le cellule indifferenziate. Inoltre i cloni di iPSC esprimevano Oct4 e Nanog, fattori di trascrizione tipici della pluripotenza, come riportato in letteratura (Thomson J.A. et al. 1998).

Purtroppo non è stato ancora possibile ottenere cellule staminali pluripotenti indotte mediante vettori adenovirali, nonostante in letteratura questo sia stato dimostrato possibile anche se con efficienza molto bassa (Stadtfield M. et al, 2008; Zhou W. et al, 2009). In questo studio sono state osservate alterazioni morfologiche suggestive di una riprogrammazione parziale. Non è chiaro il motivo per cui non sia stato possibile riprogrammare le cellule staminali con vettori adenovirali. E' possibile che sia necessario ottimizzare il protocollo di riprogrammazione modificando la dose e la stechiometria dei vettori adenovirali. E' possibile però che l'infezione con i vettori adenovirali induca una risposta cellulare, come per esempio l'attivazione delle vie di segnalazione del toll-like receptors, tale da costituire un blocco alla riprogrammazione. Per verificare questa ipotesi saranno eseguiti studi dell'espressione genica mediante microarray per confrontare l'effetto dei vettori SeV, retrovirali, episomali, e adenovirali sul profilo di espressione genica e sulle modificazioni epigenetiche nelle prime ore dopo l'infezione.

Le cellule iPSC, ottenute mediante riprogrammazione con vettori episomali, sono state sottoposte a differenziamento diretto in megariociti. Questa è un'innovazione, poiché normalmente i protocolli di differenziamento in megacariociti realizzati sulle cellule staminali embrionali o iPS prevedono sempre una fase di differenziamento verso i precursori ematopoietici (HPSC) chiamati anche ES-sac, seguita da un successivo differenziamento in megacariociti maturi in grado di produrre piastrine (Takayama N. et al., 2008). E' stato infatti dimostrato che seminando cellule staminali embrionali o iPSC su un feeder layer di cellule stromali OP9 e trattando quest'ultime con il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) per sette giorni si ottengono le cosiddette ES-sac

che sono delle vescicole contengono molte cellule sferiche tra cui una notevole percentuale di precursori ematopoietici (Takayama N. et al., 2008). Il fattore di crescita VEGF favorisce notevolmente la formazione di queste sacche. Dopo sette giorni con questo trattamento le ES-sac sono state disassemblate, le cellule ottenute seminate in un nuovo feeder layer di OP9 e trattate con TPO e altre citochine tra cui il fattore delle cellule staminali (SCF), IL-3, IL-6, IL-9, IL-11 e BMP4. Dopo alcuni giorni, le cellule trattate, hanno cominciato a differenziare in megacariociti maturi in grado di produrre piastrine funzionanti (Takayama N. et al., 2008, Takayama N. et al., 2012). La trombopoietina (TPO) è una proteina in grado di attivare varie vie del segnale come JAK-STAT, MAPK-ERK1/2 e PI3K-v-akt e di controllare così la maturazione dei megacariociti e il conseguente rilascio delle piastrine (Nagasawa T. et al., 1998).

Nel presente studio, per differenziare le cellule iPSC è stato utilizzato il protocollo che viene normalmente utilizzato per il differenziamento di precursori ematopoietici circolanti in megacariociti, saltando così la fase di pre-differenziamento a HPSC (Nuzzo F. et al., 2013). In questo protocollo, le iPSC, seminate in singola cellula in modo da formare un monostrato omogeneo, sono state trattate solo con TPO, SCF e IL-3 per circa 15 giorni e fatte crescere sulla matrice Matrigel. Questo protocollo è molto più rapido di quello precedentemente esposto (circa 24 giorni). Dagli esperimenti effettuati, le cellule iPSC differenziate con questo protocollo risultano morfologicamente molto simili ai megacariociti, presentano estroflessioni ramificate sulla superficie come i megacariociti maturi e rilasciano nel terreno circostante cellule anucleate che potrebbero essere piastrine. Certamente sarà necessario compiere maggiori analisi di caratterizzazione su queste cellule, come ad esempio analisi citofluorimetriche per l'antigene di superficie CD34 e CD41a, espressi nei megacariociti maturi, analisi di immunofluorescenza con anticorpi anti-CD41a per identificare i filamenti di pro-piastrine e analisi di RT-PCR per analizzare i geni espressi specificamente nei megacariociti maturi. Inoltre potrebbe essere interessante trattare con lo stesso protocollo anche i cloni di iPSC derivati con i vettori retrovirali e SeV e analizzare le possibili differenze fenotipiche nei

megacariociti ottenuti, per verificare se il metodo di riprogrammazione può interferire con il differenziamento verso questo lineage.

In conclusione sono stati derivati con successo cloni di iPSC con vettori virali integranti retrovirali, con vettori virali non integranti derivati dal virus del Sendai e con vettori non virali, non integranti, quali i vettori episomali. Tutti i cloni ottenuti esprimevano tutti i marcatori di pluripotenza ed erano in grado di derivare tessuti da tutti e tre i foglietti germinativi.

Inoltre è stato testato un nuovo protocollo di differenziamento diretto a megacariociti che potrebbe portare alla produzione di piastrine, utili alla terapia di pazienti affetti da trombocitopenia, in tempi molto brevi con un metodo meno laborioso di quelli attualmente utilizzati.

BIBLIOGRAFIA

Anokye-Danso F., Trivedi C.M., Juhr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y., Zhang Y., Yang W., Gruber P.J., Epstein J.A., Morrissey E.E. (2011) “Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency,” *Cell Stem Cell* 8(4):376–388.

Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. (2008) “Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells” *Science* 321:699-702.

Araki R., Uda M., Hoki Y., Sunayama M., Nakamura M., Ando S., Sugiura M., Ideno H., Shimada A., Nifuji A. (2013). “Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells” *Nature* 494, 100-104.

Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destrempes M.M., Cammuso C., Williams J.L., Nims S.D., Porter C.A., Midura P., Palacios M.J., Ayres S.L., Denniston R.S., Hayes M.L., Ziomek C.A., Meade H.M., Godke R.A., Gavin W.G., Overström E.W., Echelard Y. (1999) “Production of goats by somaticcell nuclear transfer” *Nat Biotechnol* 17:456–461.

Balduini C.L., Cattaneo M., Fabris F., Gresele P., Iolascon A., Pulcinelli F.M., Savoia A. (2003) “Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine” *Haematologica* 88:582–92.

Belli, M., Marchetto M. C., Gage F. H. and Mummery C. L. (2012) “Induced pluripotent stem cells: the new patient?” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 713-726.

Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M. (2000) "Production of cloned pigs from in vitro systems" *Nat Biotechnol* 18:1055–1059.

Bortvin A., Eggan K., Skaletsky H., Akutsu H., Berry D.L., Yanagimachi R., Page D.C., Jaenisch R. (2003) "Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei" *Development* 130:1673–1680.

Brambrink T., Foreman R., Welstead G.G., Lengner C.J., Wernig M., Suh H., Jaenisch R. (2008) "Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells" *Cell Stem Cell* 2, 151–159.

Briggs R., King T.J. (1952) "Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs" *Proc Natl Acad Sci* 38:455–63.

Cai J., Weiss M.L., Rao M.S. (2004) "In search of stemness" *Exp Hematol*;32:585-598.

Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. (1996) "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line" *Nature* 380, 64–66.

Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. (2009) "Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector" *Proc Natl Acad Sci* 106: 157–162.

Chakraborty S., Christoforou N., Fattahi A., Herzog R. W., Leong K. W. (2013) "A robust strategy for negative selection of Cre-loxP recombination-based

excision of transgenes in induced pluripotent stem cells” *PLoS One* 8(5):e64342.

Chen G., Gulbranson D. R., Hou Z., Bolin J. M., Ruotti V., Probasco M. D., Smuga-Otto K., Howden S. E., Diol N. R., Propson N. E. (2011). “Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture” *Nat. Methods* 8, 424-429.

Chesné P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. (2002) “Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells” *Nat Biotechnol* 20:366–369.

Chou B.K., Mali P., Huang X., Ye Z., Dowey S.N., Resar L.M., Zou C., Zhang Y.A., Tong J. and Cheng L. (2011) “Efficient human iPS cell derivation by a nonintegrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures” *Cell Res* 21: 518-529.

Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. (2005) “Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells” *Science* 309:1369-1373.

Daheron L., D'Souza S. (2012) “Blood - SeV derived fibroblast generated iPSCs” *StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-2012 Jun 10.*

Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. (1987) “Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts” *Cell* 51, 987–1000.

Desnuelle, C., Dib, M., Garrel, C. and Favier, A. (2001). “A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group” *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 2, 9-18.

Despots C. and Ding S. (2010) “Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells” *Methods in Molecular Biology*, 636:207–218.

Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Golland R., Wichterle H., Henderson C.E., Eggan K. (2008) “Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons” *Science* 321: 1218-1221.

Ding S., Wu X., Li G., Han M., Zhuang Y. and Xu T. (2005) “Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice” *Cell* 122: 473-483.

Do J.T., Han D.W., Gentile L., Sobek-Klocke I., Stehling M., Schöler H.R. (2008) “Enhanced reprogramming of Xist by induced upregulation of Tsix and Dnmt3a” *Stem Cells* 26:2821-2831.

Ebert A. D., Yu J., Rose F. F. Jr, Mattis V. B., Lorson C. L., Thomson J. A. and Svendsen C. N. (2009) “Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient” *Nature* 457, 277-280.

Ebert A. D., Liang P. and Wu J. C. (2012) “Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform” *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60, 408-416.

Fulka J. Jr., Miyashita N., Nagai T., Ogura A. (2004) “Do cloned mammals skip a reprogramming step?” *Nature Biotechnology* 22, 25 – 26.

Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K. and Hasegawa M. (2009) “Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector

based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome" *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 348-362.

Gaines P., Geiger J.N., Knudsen G., Seshasayee D., Wojchowski D.M. (2000)
"GATA-1- and FOG dependent activation of megakaryocytic α IIb gene expression" *J Biol Chem* 275:34114-34121.

Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G. (2003) "Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin" *Nature* 424:635.

Gaur M., Kamata T., Wang S., Moran B., Shattil S.J., Leavitt A.D. (2006)
"Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function" *J Thromb Haemost* 4:436-442.

Giorgetti A., Montserrat N., Aasen T., Gonzalez F., Rodríguez-Pizà I., Vassena R., Raya A., Boué S., Barrero M. J., Corbella B. A. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2" *Cell Stem Cell* 5, 353-357.

Gonzalez F., Barragan Monasterio M., Tiscornia G., Montserrat Pulido N., Vassena R., Batlle Morera L., Rodriguez Piza I. and Izpisua Belmonte J.C. (2009) "Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector" *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8918-8922.

Guerriero R., Mattia G., Testa U., Chelucci C., Macioce G., Casella I., Samoggia P., Peschle C., Hassan H.J. (2001) "Stromal cell-derived factor 1 α increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells" *Blood* 97:2587-2595.

Guha P., Morgan J. W., Mostoslavsky G., Rodrigues N. P. and Boyd A. S. (2013)
“Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells” *Cell Stem Cell* 12, 407-412.

Gurdon J.B. (1962) “The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles” *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10, 622–640.

Haase A., Olmer R., Schwanke K., Wunderlich S., Merkert S., Hess C., Zweigerdt R., Gruh I., Meyer J., Wagner S. (2009). “Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood” *Cell Stem Cell* 5, 434-441.

Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., Sun C. W., Meissner A., Cassady J. P., Beard C., Brambrink, T. Wu L. C., Townes T. M. (2007). “Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin” *Science* 318, 1920-1923.

Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R., (2010). “Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues” *Cell* 143, 508–525.

Hockemeyer D., Soldner F., Beard C., Gao Q., Mitalipova M., DeKolver R. C., Katibah G. E., Amora R., Boydston E. A., Zeitler B. et al. (2009) “Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases” *Nat. Biotechnol.* 27, 851-857.

Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C. S., Gao Q., Cassady J. P., Cost G. J., Zhang L., Santiago Y., Miller J. C. et al. (2011) “Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases” *Nat. Biotechnol.* 29, 731-734.

Hu K., Yu J., Suknuntha K., Tian S., Montgomery K., Choi K.D., Stewart R., Thomson J.A. and Slukvin I.I. (2011) “Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cell”. *Blood* 117: e109-119.

Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. (2008) “Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small molecule compounds” *Nature Biotechnology*, 26(7) 795–797.

Ichida J.K., Blanchard J., Lam K., Son E.Y., Chung J.E., Egli D., Loh K.M., Carter A.C., Di Giorgio F.P., Koszka K., Huangfu D., Akutsu H., Liu D.R., Rubin L.L., Eggan K. (2009) “A small-molecule inhibitor of Tgf- β signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing nanog” *Cell Stem Cell* 5(5) 491–503.

Jia F., Wilson K.D., Sun N., Gupta D.M., Huang M., Li Z., Panetta N.J., Chen Z.Y., Robbins R.C., Kay M.A., Longaker M.T., Wu J.C. (2010) “A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells” *Nat Methods* 7(3):197-9.

Jin Z.B., Okamoto S., Xiang P., Takahashi M. (2012) “Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Retinitis Pigmentosa Patient for Disease Modeling” *Stem Cells Trans Med* 1:503-9.

Johnson P.A. (2003) “Reprogramming in inter-species embryonal carcinoma-somatic cell hybrids induces expression of pluripotency and differentiation markers” *Cloning Stem Cells* 5:339-354.

Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P. and Woltjen K. (2009) “Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors” *Nature* 458: 771-775.

- Kajiwara M., Aoi T., Okita K., Takahashi R., Inoue H., Takayama N., Endo H., Eto K., Toguchida J., Uemoto S. (2012).** “Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 12538-12543.
- Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. (1998)** “Eight calves cloned from somatic cells of a single adult” *Science* 282:2095–2098.
- Kaufman R.M., Airo R., Pollack S., Crosby W.H. (1965)** “Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung” *Blood* 26:720-731.
- Kaushansky K. (2008)** “Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis” *Blood*; 111:981-986.
- Kim M.K., Jang G., Oh H.J., Yuda F., Kim H.J., Hwang W.S., Hossein M.S., Kim J.J., Shin N.S., Kang S.K., Lee B.C. (2007)** “Endangered wolves cloned from adult somatic cells” *Cloning Stem Cells* 9:130–137.
- Kimura H., Tada M., Nakatsuji N., Tada T. (2004)** “Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells” *Mol Cell Biol* 24:5710-5720.
- Kishigami S., Mizutani E., Ohta H., Hikichi T., Thuan N.V., Wakayama S., Bui H.T., Wakayama T. (2006)** “Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer” *Biochem Biophys Res Commun.* 340:183–189.
- Kosaki G. (2005)** “In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets?” *Int J Hematol* 81:208-219.

Kudva Y.C., Ohmine S., Greder L.V., Dutton J.R., Armstrong A., De Lamo J.G., Khan Y.K., Thatava T., Hasegawa M., Fusaki N., Slack J.M., Ikeda Y. (2012) “Transgene-Free Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes” *Stem Cells Trans Med.* 1:451-61.

Lee B.C., Kim M.K., Jang G., Oh H.J., Yuda F., Kim H.J., Hossein M.S., Kim J.J., Kang S.K., Schatten G., Hwang W.S. (2005) “Dogs cloned from adult somatic cells” *Nature* 436:641.

Lee C.H., Kim J.H., Lee H.J., Jeon K., Lim H., Choi H.Y., Lee E.R., Park S.H., Park J.Y., Hong S., Kim S., Cho S.G.(2011) “The generation of iPS cells using non-viral magnetic nanoparticle based transfection” *Biomaterials* 32:6683–6691.

Li Z., Rana T.M. (2012) “A kinase inhibitor screen identifies small-molecule enhancers of reprogramming and iPS cell generation” *Nat Commun* 3:1085.

Lin T., Ambasudhan R., Yuan X., Li W., Hilcove S., Abujarour R., Lin X., Hahm H.S., Hao E., Hayek A., Ding S. (2009) “A chemical platform form improved induction of human iPSCs” *Nature Methods*, 6(11) 805–808.

Long M.W. (1998) “Megakaryocyte differentiation events” *Semin Hematol* 35:192-199.

Lu S.J., Feng Q., Caballero S., Chen Y., Moore M.A., Grant M.B., Lanza R. (2007) “Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells” *Nat Methods*. 4(6):501-9.

Lu S.J., Li F., Yin H., Feng Q., Kimbrel E.A., Hahm E., Thon J.N., Wang W., Italiano J.E., Cho J., Lanza R. (2011) “Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice” *Cell Res.* 21(3):530-45.

Lu S.J., Luo C., Holton K., Feng Q., Ivanova Y., Lanza R. (2008) “Robust generation of hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cell” *Regen Med* 3:693-704.

Lyssiotis C.A., Foreman R.K., Staerk J., Garcia M., Mathur D., Markoulaki S., Hanna J., Lairson L.L., Charette B.D., Bouchez L.C., Bollong M., Kunick C., Brinker A., Cho C.Y., Schultz P.G., Jaenisch R. (2009) “Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4,” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(22):8912–8917.

Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C. and Hochedlinger K. (2008) “A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells” *Cell Stem Cell* 3: 340-345.

Markoulaki S., Hanna J., Beard C., Carey B.W., Cheng A.W., Lengner C.J., Dausman J.A., Fu D., Gao Q., Wu S., Cassady J.P., Jaenisch R. (2009) “Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors” *Nat Biotechnol* 27: 169–171.

Matsunaga T., Tanaka I., Kobune M., Kawano Y., Tanaka M., Kuribayashi K., Iyama S., Sato T., Sato Y., Takimoto R., Takayama T., Kato J., Ninomiya T., Hamada H., Niitsu Y. (2006) “Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34+ cells” *Stem Cells* 24:2877-2887.

Miyoshi N., Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dewi D.L., Kano Y., Nishikawa S., Tanemura M., Mimori K., Tanaka F., Saito T., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. (2011) “Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs,” *Cell Stem Cell* 8(6):633–638.

Montserrat N., Garreta E., Gonzalez F., Gutierrez J., Eguizabal C., Ramos V., Borros S. and Izpisua Belmonte J.C. (2011) “Simple generation of human induced pluripotent stem cells using poly-betaamino esters as the non-viral gene delivery system” *J Biol Chem* 286: 12417-12428.

Munsie M.J., Michalska A.E., O'Brien C.M., Trounson A.O., Pera M.F., Mountford P.S. (2000) “Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei” *Curr Biol.* 10:989–992.

Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka S. (2008) “Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts” *Nature Biotechnology* 26,101–106.

Nakagawa M., Takizawa N., Narita M., Ichisaka T., and Yamanaka S. (2010) “Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14152–14157.

Nakajima F., Tokunaga K. and Nakatsuji N. (2007). “Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy” *Stem Cells* 25, 983-985.

Nakamura N., Saeki K., Mitsumoto M., Matsuyama S., Nishio M., Saeki K., Hasegawa M., Miyagawa Y., Ohkita H., Kiyokawa N., Toyoda M., Akutsu H., Umezawa A., Yuo A. (2012) “Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays” *Cell Reprogram.* 14(2):171-85.

Nanbo A., Sugden A. and Sugden B. (2007) “The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells” *Embo J* 26: 4252-4262.

Narsinh K.H., Jia F., Robbins R.C., Kay M.A., Longaker M.T. and Wu J.C. (2011) “Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors” *Nat Protoc* 6:78-88.

Nishimura K., Sano M., Ohtaka M., Furuta B., Umemura Y., Nakajima Y., Ikehara Y., Kobayashi T., Segawa H., Takayasu S., Sato H., Motomura K., Uchida E., Kanayasu-Toyoda T., Asashima M., Nakauchi H., Yamaguchi T. and Nakanishi M. (2011) “Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming” *J Biol Chem* 286: 4760-4771.

Ogonuki N., Inoue K., Yamamoto Y., Noguchi Y., Tanemura K., Suzuki O., Nakayama H., Doi K., Ohtomo Y., Satoh M., Nishida A., Ogura A. (2002) “Early death of mice cloned from somatic cells” *Nat Genet.* 30:253–254.

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. (2007) “Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells” *Nature* 448: 313–317.

Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., Nakagawa M., Tanabe K., Tezuka K. (2011). “A more efficient method to generate integration-free human iPS cells” *Nat. Methods* 8, 409-412.

Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T. and Yamanaka S. (2008) “Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors” *Science* 322: 949-953.

Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N. and Yamanaka S. (2013). “An efficient non-viral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells” *Stem Cells* 31, 458-466.

Ono Y., Wang Y., Suzuki H., Okamoto S., Ikeda Y., Murata M., Poncz M., Matsubara Y. (2012) “Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf” *Blood*. 120(18):3812-21.

Osafune K., Caron L., Borowiak M., Martinez R. J., Fitz-Gerald C. S., Sato Y., Cowan C. A., Chien K. R. and Melton D. A. (2008). “Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines” *Nat. Biotechnol.* 26, 313-315.

Park I.H., Lerou P.H., Zhao R., Huo H., Daley G.Q. (2008) “Generation of human-induced pluripotent stem cells” *Nat Protoc* 3:1180-1186.

Pasha Z., Haider H. K., and Ashraf M. (2011) “Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness with a single small molecule to generate cardiac progenitor cells” *PLoS ONE* 6(8):ID e23667.

Patel S.R., Hartwig J.H., Italiano J.E. Jr. (2005) “The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets” *J Clin Invest* 115:3348-3354.

Reems J.A., Pineault N., Sun S. (2010) “In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art” *Transfus Med Rev* 24:33-43.

Rhee Y.H., Ko J.Y., Chang M.Y., Yi S.H., Kim D., Kim C.H., Shim J.W., Jo A.Y., Kim B.W., Lee H., Lee S.H., Suh W., Park C.H., Koh H.C., Lee Y.S., Lanza R., Kim K.S. and Lee S.H.(2011) “Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease” *J Clin Invest* 121:2326-2335.

Romli F., Alitheen N.B., Hamid M., Ismail R., Rahman N.M. (2012) “Current techniques in reprogramming cell potency” *J. Cell. Biochem* 114(6):1230-7.

Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H. (1997) “Human factorIX transgenic sheep produced by transfer of nuclei fromtransfected fetal fibroblasts” *Science* 278:2130–2133.

Seki T., Yuasa S. and Fukuda K. (2011). “Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells” *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 18, 4A.3.1-4A.3.9.

Seki T., Yuasa S., Fukuda K. (2012) “Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus” *Nat Protoc.* 7(4):718-28.

Seki T., Yuasa S., Oda M., Egashira T., Yae K., Kusumoto D., Nakata H., Tohyama S., Hashimoto H., Kodaira M., Okada Y., Seimiya H., Fusaki N., Hasegawa M. and Fukuda K. (2010) “Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells” *Cell Stem Cell* 7: 11-14.

Shefner, J. M., Cudkowicz, M. E., Schoenfeld, D., Conrad, T., Taft, J., Chilton, M., Urbinelli, L., Qureshi, M., Zhang, H., Pestronk, A. et al. (2004). "A clinical trial of creatine in ALS" *Neurology* 63, 1656-1661.

Shi Y., Do J. T., Despons C., Hahm H. S., Schöler H. R., and Ding S. (2008) "A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells" *Cell Stem Cell*, 2:525–528.

Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., Buck S., Murphy K., Lyons L., Westhusin M. (2002) "A cat cloned by nuclear transplantation" *Nature* 415:859.

Si-Tayeb K., Noto F.K., Sepac A., Sedlic F., Bosnjak Z.J., Lough J.W. and Duncan S.A. (2010) "Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors" *BMC Dev Biol* 10: 81.

Sommer C.A., Sommer A.G., Longmire T.A., Christodoulou C., Thomas D.D., Gostissa M., Alt F.W., Murphy G.J., Kotton D.N., Mostoslavsky G. (2010) "Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector" *Stem Cells* 28, 64–74.

Sommer C.A., Stadtfeld M., Murphy G.J., Hochedlinger K., Kotton D.N., Mostoslavsky G. (2009) "Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette" *Stem Cells* 27: 543–549.

Stadtfeld M., Hochedlinger K. (2010) "Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications" *Genes Dev.* 24, 2239–2263.

- Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. (2008)** “Induced pluripotent stem cells generated without viral integration” *Science* 322, 945–949.
- Tachibana M., Amato P., Sparman M., Gutierrez N.M., Tippner-Hedges R., Ma H., Kang E., Fulati A., Lee H.S., Sritanandomchai H., Masterson K., Larson J., Eaton D., Sadler-Fredd K., Battaglia D., Lee D., Wu D., Jensen J., Patton P., Gokhale S., Stouffer R.L., Wolf D., Mitalipov S. (2013)** “Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer” *Cell*. 153(6):1228-38.
- Tada M., Tada T., Lefebvre L., Barton S.C., Surani M.A. (1997)** “Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells” *EMBO J* 16:6510-6520.
- Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. (2001)** “Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells” *Curr Biol* 11:1553-1558.
- Takahashi K. and Yamanaka S. (2006).** “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors” *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. and Yamanaka S. (2007).** “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors” *Cell* 131, 861-872.
- Takayama N., Nishikii H., Usui J., Tsukui H., Sawaguchi A., Hiroyama T., Eto K., Nakauchi H. (2008)** “Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors” *Blood* 111:5298-5306.

Takenaka C., Nishishita N., Takada N., Jakt L. M. and Kawamata S. (2009).

“Effective generation of iPS cells from CD34(+). cord blood cells by inhibition of p53” *Exp. Hematol.* 38, 154-62.

Tanaka S., Oda M., Toyoshima Y., Wakayama T., Tanaka M., Yoshida N., Hattori

N., Ohgane J., Yanagimachi R., Shiota K. (2001) “Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer” *Biol Reprod.* 65:1813–1821.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J.J.,

Marshall V. S. and Jones J. M. (1998). “Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts” *Science* 282, 1145-1147.

Trokovic R., Weltner J., Manninen T., Mikkola M., Lundin K., Hämäläinen R.,

Suomalainen A., Otonkoski T. (2013) “Small molecule inhibitors promote efficient generation of induced pluripotent stem cells from human skeletal myoblasts” *Stem Cells Dev.* 1;22(1):114-23.

Deutsch V.R., Tomer A. (2013) “Advances in megakaryocytopoiesis and

thrombopoiesis: from bench to bedside” *Br J Haematol.* 161(6):778-93.

Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. (1998)

“Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei” *Nature* 394:369–374.

Wakayama T., Tabar V., Rodriguez I., Perry A.C., Studer L., Mombaerts P. (2001)

“Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer” *Science* 292:740–743.

Wang W., Yang J., Liu H., Lu D., Chen X., Zenonos Z., Campos L.S., Rad R., Guo G., Zhang S., Bradley A., Liu P. (2011) “Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1,” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(45):18283–18288, 2011.

Wang X., Crispino J.D., Letting D.L., Nakazawa M., Poncz M., Blobel G.A. (2002) “Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors” *EMBO J* 21:5225-5234.

Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., Daley G.Q., Brack A.S., Collins J.J., Cowan C., Schlaeger T.M., Rossi D.J. (2010) “Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA” *Cell Stem Cell* 7,618–630.

Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., Daley G.Q., Brack A.S., Collins J.J., Cowan C., Schlaeger T.M., Rossi D.J. (2010) “Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA,” *Cell Stem Cell* 7(5):618–630.

Weissman I. L. (2000) “Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution” *Cell*, vol. 100, 157–168.

Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997) “Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells” *Nature* 385:810–3.

Wobus A.M. (2001) “Potential of embryonic stem cells” *Mol Aspects Med* 22:149-164.

Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hamalainen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., Kaji K., Sung H.K. and Nagy A. (2009) “piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells” *Nature* 458: 766-770.

Woods G.L., White K.L., Vanderwall D.K., Li G.P., Aston K.I., Bunch T.D., Meerdo L.N., Pate B.J. (2003) “A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer” *Science* 301:1063.

Wu Y., Melton D.W., Zhang Y., Hornsby P.J. (2009) “Improved coinfection with amphotropic pseudotyped retroviral vectors.” *J Biomed Biotechnol.* 2009:901079.

Yamanaka S. (2010). “Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible” *Cell Stem Cell* 7, 1-2.

Yamanaka S., Blau HM. (2010). “Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches” *Nature.* 10;465(7299):704-12.

Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I. I. and Thomson J. A. (2009). “Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences” *Science* 324, 797-801.

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. (2007). “Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells” *Science* 318, 1917-1920.

Yusa K., Rad R., Takeda J. and Bradley A (2009) “Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon” *Nat Methods* 6: 363-369.

Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Schöler H.R., Duan L., Ding S. (2009) "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins" *Cell Stem Cell* 4, 381–384.

Zhou Q., Renard J.P., Le Friec G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi J. (2003) "Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation" *Science* 302:1179.

Zhou W. and Freed CR. (2009) "Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to in transgene-free induced pluripotent stem cells" *Stem Cells* 27: 2667-2674.

Zhu S., Li W., Zhou H., Wei W., Ambasudhan R., Lin T., Kim J., Zhang K., Ding S. (2010) "Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds," *Cell Stem Cell* 7(6):651–655.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la Prof.ssa Luisa Barzon e il Prof. Giorgio Palù per avermi dato la possibilità di fare questa esperienza.

Ringrazio tutti i colleghi del gruppo per avermi aiutato e consigliato nelle varie fasi del dottorato. Un particolare ringraziamento va alla Dott.ssa Marta Trevisan che, con molta pazienza, mi ha insegnato molto e supportato in tutti questi anni e alla Dott.ssa Valeria Martinello, Giovanna Desole e Dott.ssa Claudia Radu per la collaborazione negli esperimenti.

Infine ringrazio mio marito e la mia famiglia che mi hanno sempre sostenuto e incoraggiato.