



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Centro Interdipartimentale di Ricerche e Servizi per la
Biologia della Rigenerazione

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA
DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
XXII CICLO

Tesi di Dottorato

RIPROGRAMMAZIONE DI PREADIPOCITI UMANI
MEDIANTE TRATTAMENTO CHIMICO

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto
Coordinatore di Indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi
Supervisore: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Dottoranda: ROSA MARMO

*A Lui, senza il quale la vita non avrebbe un senso,
ai mie cari genitori che mi hanno donato la vita,
al mio amato Giuseppe che l'ha resa splendida.*

INDICE

INTRODUZIONE

Abbreviazioni	pag. 3
Sommario	pag. 4
Abstract	pag. 5
1. Le cellule staminali	pag. 6
2. La riprogrammazione cellulare	pag. 10
3. Cellule iPS: dal modello animale all'uomo	pag. 13
4. Approccio chimico per la generazione di iPS	pag. 15

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari	pag. 22
2. Trattamento dei preadipociti con 5-azacitidina	pag. 23
3. Valutazione della vitalità cellulare: Saggio MTT	pag. 23
4. Protocolli di differenziamento cellulare:	
a. Adipogenico	pag. 24
b. Osteogenico	pag. 25
c. Condrogenico	pag. 26
d. Miogenico	pag. 26
5. Colorazioni citochimiche:	
a. Oil Red O	pag. 28
b. Nile Red	pag. 28
c. Alizarina Red	pag. 28
d. Fosfatasi Alcalina	pag. 29
6. Anticorpi	pag. 29
7. Analisi Citofluorimetrica	pag. 32
8. Immunofluorescenza	pag. 33
9. Microscopia Confocale	pag. 35
10. Real Time PCR	pag. 40
11. Western Blotting	pag. 47

RISULTATI

1. Modelli cellulari distinti di preadipociti sono comparabili	pag. 51
2. La 5-azacitidina non esercita un'azione citotossica sui preadipociti	pag. 62
3. La demetilazione determina la sovraespressione dei geni OCT 4, NANOG e SOX-2	pag. 64
- Preadipociti commerciali	pag. 67
- Preadipociti P0208	pag. 70
4. La 5-azacitidina modula l'espressione genica globale dei preadipociti	pag. 72
5. La 5-azacitidina induce la sovraespressione del Fattore di Trascrizione NANOG	pag. 75
6. Le cellule espanse dopo trattamento si selezionano per Marcatori specifici	pag. 77
7. La 5-azacitidina permette di ottenere <i>in vitro</i> cellule	

“Riprogrammate” e pluripotenti

pag. 87

DISCUSSIONE

pag. 107

BIBLIOGRAFIA

pag. 110

ABBREVIAZIONI

APS = Penicillina/Streptomicina

Aza = azacitidina

BSA = Albumina di siero bovino

DMEM LG = Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose (1000 mg/L)

DMEM HG = Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4500 mg/L)

EPC = Cellule progenitrici endoteliali

ESC = Cellule Staminali Embrionali

FBS = Fetal Bovine Serum

FCS = Fetal Calf Serum

FITC = Fluorescein-5-isothiocyanate

For = Forward

HSC = Cellule staminali ematopoietiche

iPS = Induced Pluripotent Stem Cells

MEM = Minimum Essential Medium Alpha Modification

MSC = Cellule staminali mesenchimali

OPN = Osteopontina

PBM-2 = Preadipocyte Basal Medium-2

PBS = Phosphate Buffered Saline

PE = Ficoeritrina

Rev = Reverse

RT = Temperatura ambiente

SCNT = Trasferimento nucleare di cellule somatiche

TC = Terreno di Coltura

UCB = Cellule da cordone ombelicale

VWF = Fattore di Von Willebrand

SOMMARIO

Recenti studi hanno dimostrato che cellule di mammifero differenziate possono de-differenziarsi mediante espressione forzata di definiti fattori per la pluripotenza; la ricerca biomedica sta cercando di ottimizzare le tecniche per l'ottenimento di cellule iPS senza l'uso di materiale genetico virale.

Scopo di questo lavoro è stato quello di ottenere cellule iPS virus-free utilizzando la strategia di lavoro proposta di seguito:

- Estrazione di precursori da tessuto adiposo di soggetto sano e coltura delle stesse in Preadipocyte Growth Medium o in DMEM addizionato con FCS al 10%.
- Caratterizzazione delle stesse cellule mediante ricerca di specifici marcatori nucleari, citoplasmatici e di superficie; a tale scopo ci si è avvalsi di una serie di metodiche tra cui l'analisi citofluorimetrica, saggi citochimici (immunofluorescenza, Oil Red O) e molecolari;
- Trattamento delle cellule con 5-azacitidina 10 μ M per 48-96 ore;
- Esecuzione di saggi di vitalità cellulare (MTT) e osservazione giornaliera mediante microscopia ottica allo scopo di monitorare la morfologia e la crescita delle cellule trattate con azacitidina.
- Realizzazione di indagini di Real Time PCR allo scopo di caratterizzare le cellule "riprogrammate" a livello molecolare, ovvero per verificare la sovra-espressione di geni indicatori di staminalità (OCT-4, Nanog, Sox-2) e la down-regolazione di geni tessuto specifici.
- Valutazione dell'espressione di fattori di trascrizione specifici delle cellule staminali mediante analisi Western Blot.
- Analisi mediante microscopia confocale e citofluorimetria per la definizione delle caratteristiche morfologiche e fenotipiche delle cellule trattate con l'agente demetilante e "riprogrammate".

ABSTRACT

Recent studies have shown that differentiated mammalian cells may de-differentiate by forced expression of defined factors for pluripotency; biomedical research is seeking optimizing techniques for obtaining iPS cells without the use of viral genetic material. The purpose of this work was to obtain iPS cells virus-free using the strategy work proposed below:

- Extraction of precursors from adipose tissue of healthy subject and cultured in Preadipocyte Growth Medium or in DMEM added with 10% FCS.
- Characterization of these cells by research of specific nuclear, cytoplasmic and surface markers; for this purpose it has been invoked in a series of methods including flow cytometry analysis, molecular and cytochemical (immunofluorescence, Oil Red O) essays;
- Treatment of cells with 5-azacitidine 10 μ M for 48-96 hours;
- Performing tests of cell viability (MTT) and daily observation by light microscopy at to monitor the morphology and growth of cells treated with azacitidine.
- Real Time PCR order to characterize the cells "reprogrammed" to molecular level, or to check the over-expression of stem cells genes (OCT-4, Nanog, Sox-2) and the down-regulation of tissue-specific genes.
- Evaluation of the expression of transcription factors stem cells specific through Western blot analysis.
- Analysis by confocal microscopy and cytometry to define the characteristics morphological and phenotypic of cells treated with demethylating agent and "reprogrammed".

INTRODUZIONE

1.LE CELLULE STAMINALI

La ricerca scientifica sulle cellule staminali può essere considerata sia un'evoluzione che una rivoluzione della medicina moderna, poiché esse rappresentano una tappa fondamentale nella storia della scoperta e dello sviluppo di nuove strategie per la terapia e lo studio della biologia.

E' possibile classificare le cellule staminali in base alla fonte, alla metodica di produzione, alla capacità proliferativa e alla capacità di differenziamento in varie tipologie cellulari adulte.

Attualmente sono state isolate e caratterizzate le:

1. **Cellule staminali embrionali (ESC)**. Esse possono essere ottenute a partire da embrioni nei primi stadi di sviluppo (blastocisti) non utilizzati nella fecondazione *in vitro* o attraverso il trasferimento nucleare, noto anche come SCNT (trasferimento nucleare di cellule somatiche); mediante tale metodica il nucleo di una cellula somatica è inserito in un uovo fecondato da cui è stato rimosso il nucleo originario. In questo caso la presenza di specifici fattori nel citoplasma della cellula uovo riporta il nucleo adulto ad uno stadio primordiale [1].
2. **Cellule staminali fetali**. Queste ultime sono estratte dalle cellule germinali o dagli organi di un feto abortito ovvero dal sangue del cordone ombelicale (UCB) al momento della nascita [2].
3. **Cellule staminali adulte**. Tali cellule possono essere isolate da 3 fonti, ovvero da Midollo Osseo, da "nicchie" presenti nei tessuti adulti e da altre fonti (tra cui il tessuto adiposo, la milza e la placenta).

Il midollo osseo è la fonte di 2 distinte popolazioni di cellule staminali adulte:

- a) cellule staminali ematopoietiche (HSC) responsabili dello sviluppo della componente cellulare del sangue (globuli bianchi, globuli rossi e piastrine) [3];
- b) cellule staminali mesenchimali (MSC) da cui originano una serie di tessuti connettivi (osso, cartilagine e tessuto adiposo) e muscolare *in vitro* ed *in vivo* [4-5].

Le cellule “niche specific” sono quelle residenti in specifiche nicchie di tessuti adulti: la necessità di continuo autorinnovamento (self-renewal) di specifici distretti anatomici richiede, infatti, la presenza di cellule multipotenti residenti.

Molti ricercatori hanno, infine, individuato altre fonti di cellule staminali tra cui il tessuto adiposo [6], la placenta [7] e la milza [8]. Alcuni studi effettuati su modelli animali dimostrano che le cellule staminali del midollo osseo possono essere introdotte nel polmone e differenziare in epitelio alveolare riparandone le lesioni [9].

- 4. **Cellule staminali “riprogrammate”**. Appartengono a questa categoria le cellule estratte da tessuti adulti e riportate, mediante varie metodiche, alla condizione di staminalità.

Tutti questi tipi di cellule staminali non possiedono le stesse proprietà o la medesima capacità di differenziare in specifici tessuti.

Le cellule staminali ottenute dagli embrioni in fase iniziale possono dare origine ai tre tipi di tessuto embrionale (endoderma, mesoderma ed ectoderma) e, pertanto, sono definite “pluripotenti”. Inoltre esse possono duplicarsi in coltura in modo simmetrico per un numero infinito di volte, mantenendo le caratteristiche originarie; una singola cellula embrionale può dare origine ad una colonia di cellule geneticamente identiche con le stesse proprietà di quella d’origine; esse, infine, sono identificabili per la posizione precisa nell’embrione, ovvero costituiscono le cellule che nella blastocisti formano

l'embrioblasto (una massa di cellule interne all'embrione nei primi giorni dal concepimento).

Utilizzando specifiche condizioni di coltura, le cellule staminali embrionali si sono differenziate in precursori ematopoietici [10], adipociti [11], cellule muscolari [12], condrociti [13] ed altri tessuti. Tali cellule presentano, tuttavia, una serie di svantaggi tra cui l'instabilità del modello cellulare, la potenziale oncogenicità oltre alle implicazioni etiche e legali [14].

Le cellule staminali estratte da cordone ombelicale presentano una più limitata capacità differenziativa, ma possono essere isolate in gran numero e senza alcuna conseguenza di tipo etico e sono già utilizzate in ambito ematoterapico [15].

Infine le cellule staminali adulte sono rare e possono essere identificate nei vari tessuti sulla base di un complesso di caratteristiche, tra cui molecole di superficie, comportamento *in vitro* e, in alcuni casi, posizione nel tessuto. Inoltre in alcuni tessuti, le cellule precursori possono essere individuate, isolate e coltivate; questo resta ancora da dimostrare per altri tessuti. Esse possono dividersi per diverse volte, ma non in modo illimitato. Infine sono definite "multipotenti": la maggior parte di esse può differenziare nel tessuto di origine, ma in altri casi è stata dimostrata la capacità delle cellule staminali adulte di dar luogo a diverse tipologie cellulari di derivazione dell'endoderma, del mesoderma e dell'ectoderma (si parla a tale proposito di "*plasticità*").

Le cellule derivate da midollo osseo, ad esempio, sono state meglio caratterizzate ed impiegate con successo nella ricostruzione del midollo osseo dopo radio e chemioterapia [16].

Inoltre è stato dimostrato che le cellule mesenchimali staminali (MSCs) possono transdifferenziare sia *in vitro* [17] che *in vivo* [18] in cellule nervose ed in cellule muscolari lisce [19].

Le popolazioni di cellule progenitrici endoteliali (EPC) residenti nel midollo osseo costituiscono una riserva naturale che può essere velocemente mobilitata in un sito di danno vascolare acuto [20]. Il potenziale terapeutico delle EPC è stato già ampiamente riconosciuto nel campo della chirurgia vascolare: l'infusione diretta delle cellule EPC in pazienti affetti da ischemia critica degli arti inferiori è stato recentemente impiegato, con esiti positivi, allo scopo di stimolare la formazione di nuovi vasi sanguigni, definita *angiogenesi* [21].

Recentemente la ricerca biomedica si è evoluta fino ad "ingegnerizzare" le colture cellulari allo scopo di individuare nuove strategie per lo studio e la cura di varie patologie.

Si parla a tale proposito di Ingegneria dei Tessuti e di Terapia genica. L'*Ingegneria dei Tessuti* è un ambito interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze per la vita allo scopo di sviluppare sostituti biologici per riparare, mantenere o migliorare le funzioni tissutali [22]. E' auspicabile che le strutture formate "de novo" possano non presentare molti dei problemi associati agli interventi di chirurgia plastica tra cui l'immunogenicità dei tessuti trapiantati ed il conseguente riparo non funzionale degli stessi [23].

La *Terapia genica* si occupa del trasferimento di materiale genetico in individui a scopo terapeutico alterando la funzione cellulare o le caratteristiche molecolari.

Da alcuni anni l'approccio combinato di terapia genica ed ingegneria dei tessuti basata sull'impiego di cellule staminali, ha permesso di ottenere cellule per la rigenerazione ed il trapianto di una serie di tessuti tra cui pelle, cartilagine ed osso.

2.LA RIPROGRAMMAZIONE CELLULARE

Vari sono stati finora gli approcci con i quali sono state riprogrammate cellule adulte, ovvero:

- a) **SCNT (Trasferimento nucleare di cellule somatiche):** tale tecnica consiste nella rimozione del nucleo da una cellula uovo [24-25]. Nell'ovocita, privato del proprio patrimonio genetico, viene introdotto il nucleo di una normale cellula somatica; dal trapianto nucleare deriva una cellula totipotente, quindi in grado di svilupparsi in un intero organismo. Lo sviluppo di cellule totipotenti create in laboratorio può essere bloccato allo stadio di blastocisti, le quali diventano una fonte di cellule staminali pluripotenti (Figura 1-A). Tuttavia, ostacoli tecnici, motivazioni etiche e regolamenti governativi hanno portato allo sviluppo di strategie alternative.
- b) **Fusione cellulare con ESC:** tale strategia ha permesso di dimostrare che è possibile riprogrammare il nucleo di una cellula somatica differenziata intervenendo sui *fenomeni "epigenetici"*, ovvero modificazioni ereditabili che non alterano la sequenza nucleotidica, ma ne modificano l'attività.

Numerose evidenze sperimentali hanno rivelato che le ESC sono capaci di indurre la pluripotenza nelle cellule somatiche con le quali sono state fuse (Figura 1-B); sono stati effettuati esperimenti di riprogrammazione con timociti [26], cellule estratte da midollo osseo [27], progenitori neuronali [28] o fibroblasti [29]. Gli ibridi cellulari ottenuti mantengono un contenuto cromosomico tetraploide e mostrano morfologia, tasso di crescita ed antigeni di superficie caratteristici delle ESC. Tutti gli ibridi, inoltre, sono in grado di formare teratomi ovvero di contribuire alla formazione dei tre foglietti germinali (ectoderma, mesoderma, endoderma).

c) **Trattamento con estratti cellulari:** la procedura in questione prevede la permeabilizzazione reversibile di una cellula somatica, l'esposizione della cellula permeabilizzata ad un estratto citoplasmatico o nucleare "riprogrammante" proveniente da varie tipologie cellulari (es: ESC, cellule uovo, cellule da carcinoma embrionale) ed, infine, la chiusura della membrana con la conseguente produzione di una cellula riprogrammata simile alle ESC (Figura 1-C).

Sulla base di tale sperimentazione è possibile dedurre che le cellule indifferenziate contengono fattori regolatori necessari per indurre la pluripotenza di una cellula differenziata. Ad esempio l'incubazione dei fibroblasti permeabilizzati NIH3T3 in un estratto di ESC murine induce la formazione di corpi embrionali che mostrano il marcatore di staminalità (Oct-4) e perdono quelli specifici delle cellule adulte, ossia la Laminina A [30].

d) **Trasduzione retrovirale dei geni della pluripotenza:** la metodica più recentemente studiata per la produzione di cellule pluripotenti indotte, anche definite cellule "*iPS*", è stata per la prima volta applicata a fibroblasti adulti di origine murina [31]; per indurre la pluripotenza, specifici fattori di trascrizione normalmente espressi nelle ESC (OCT4, Sox2, Klf4, and c-Myc) sono stati trasdotti contemporaneamente in fibroblasti murini mediante l'uso di vettori retrovirali (Figura 1-D). Le cellule iPS prodotte presentano morfologia, profilo genico e marcatori di superficie tipici delle ESC murine; tali iPS contribuiscono, inoltre alla formazione dei 3 foglietti embrionali e, dunque, alla produzione di teratomi; esse, infine, partecipano alla formazione di feti-chimera [31].

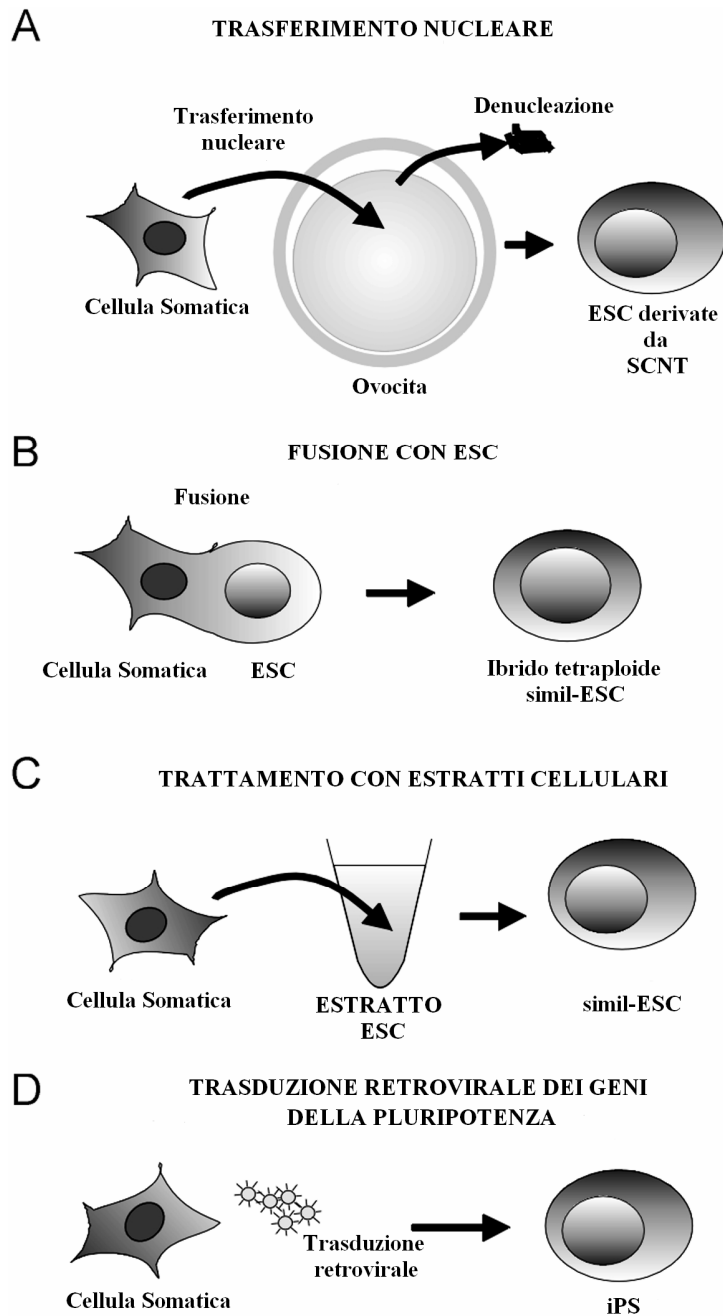


Figura 1.

Strategie di riprogrammazione di cellule somatiche adulte: A) Trasferimento del nucleo di una cellula somatica in un ovocita non fertilizzato. Dallo sviluppo dell'embrione clonato fino allo stadio di blastocisti derivano ESC-SCNT; B) La fusione di una cellula somatica con una ESC produce un ibrido tetraploide con caratteristiche simili alle ESC; C) L'incubazione di una cellula somatica con estratti provenienti da ESC promuove eventi di riprogrammazione nucleare ed aumenta la pluripotenza *in vitro*; D) La trasduzione retrovirale dei fattori di trascrizione delle ESC (OCT4, Sox2, Klf4, and c-Myc) è sufficiente per produrre iPS, cellule staminali pluripotenti indotte a partire da una cellula somatica.

3.CELLULE iPS: DAL MODELLO ANIMALE ALL'UOMO

Molti studi pubblicati negli ultimi anni non solo hanno riprodotto, ma hanno addirittura esteso lo studio effettuato da Takahashi and Yamanaka [31], confermando rigorosamente la pluripotenza ed il potenziale differenziativo delle cellule iPS di origine murina [32-34]. Nell'anno 2007 gli stessi ricercatori Takahashi and Yamanaka hanno dimostrato che è possibile ottenere cellule iPS anche a partire da cellule umane [35]: essi hanno selezionato fibroblasti adulti umani estratti da derma, tessuto sinoviale e prepuzio neonatale di vari donatori, hanno trasdotto tutte le popolazioni cellulari utilizzando vettori retrovirali contenenti i 4 transgeni OCT4, Sox2, Klf4, and c-Myc ed hanno mantenuto le cellule nelle condizioni di coltura di norma utilizzate per le ESC umane. E' stato dimostrato che dopo 30 giorni si ottengono *in vitro* colonie di cellule iPS simil ESC che possono essere ulteriormente espanse (Figura 2). Allo scopo di comparare tali cellule iPS con le ESC umane, sono stati eseguiti vari saggi dai quali è emerso che esse presentano le medesime caratteristiche ovvero simile morfologia, espressione dei marcatori di superficie, stato epigenetico, formazione di corpi embrioidi *in vitro*, differenziamento neuronale e cardiomiocitario (in accordo con i protocolli di differenziamento per le ESC) e formazione di teratomi *in vivo*. Inoltre mediante DNA microarray è stato dimostrato che sussiste un notevole grado di somiglianza tra i 2 pattern di espressione genica; in particolare l'analisi del DNA genomico e delle STR (short tandem repeats) ha dimostrato che cloni umani di iPS indipendenti derivano dalla popolazione di fibroblasti umani di partenza.

Questi progressi potrebbero consentire in futuro la produzione di linee cellulari-staminali paziente-specifiche utili per lo studio *in vitro* di varie patologie nonché a scopo di trapianto e riparazione di un danno tissutale.

La produzione di cellule iPS consente, inoltre, di ottenere in laboratorio modelli cellulari per eventuali studi farmacologici e tossicologici; tale sistema di riprogrammazione potrebbe, infine, risolvere i conflitti di natura morale, religiosa e politica che riguardano vari aspetti della ricerca svolta utilizzando le ESC umane.

Tuttavia la riprogrammazione cellulare ottenuta mediante trasduzione di fattori genetici non esclude la possibilità di mutagenesi inserzionale del retrovirus [33].

La ricerca scientifica più attuale sta tentando di individuare un nuovo metodo per riprogrammare le cellule, senza l'uso di retrovirus e più in generale evitando l'uso del trasferimento genico. Essendo, infatti, Klf4 e c-Myc fattori che intervengono sui fenomeni epigenetici, ovvero che modificano la cromatina producendo l'immortalizzazione delle cellule, si è pensato di cercare piccole molecole che possano sostituire nello specifico tali fattori [36] o che possano più in generale intervenire sul DNA in modo tale da modificare l'espressione genica riattivando i geni embrionali e spegnendo quelli dello stadio adulto.

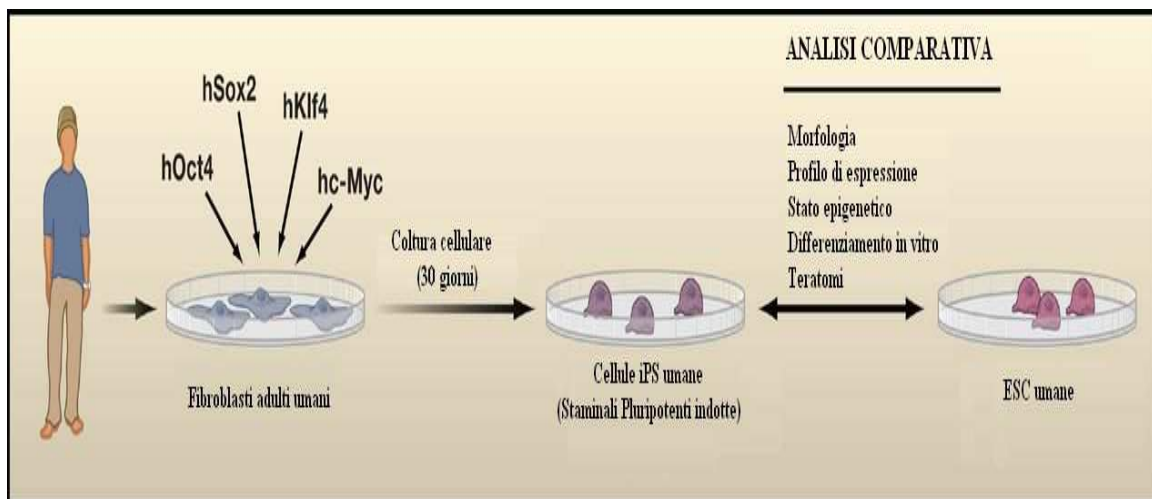


Figura 2.

Fattori di trascrizione per la produzione di iPS: Fibroblasti adulti di origine umana sono stati esposti a vettori retrovirali che esprimono 4 transgeni codificanti per i fattori di trascrizione hOCT4, hSox2, hKlf4, and hc-Myc, (h=human, umano). Dopo 30 giorni di coltura si ottengono iPS umane, cellule staminali pluripotenti indotte che possono essere isolate ed ulteriormente espanse. L'analisi comparativa delle cellule iPS e delle ESC ha evidenziato un elevato grado di similarità relativo a morfologia, espressione di marcatori di superficie, profilo genico, stato epigenetico e potenziale differenziativo *in vitro* ed *in vivo*.

4.APPROCCIO CHIMICO PER LA GENERAZIONE DI iPS

La comprensione di molti meccanismi che regolano il destino cellulare, l'acquisizione dell'abilità di manipolare e controllare il destino delle cellule staminali [37-38] ed, infine, la scoperta dei processi che sono alla base della riprogrammazione di cellule adulte hanno prodotto molto entusiasmo nella ricerca biomedica; gli studi più innovativi [39] hanno lo scopo di produrre cellule per la sostituzione di tessuti danneggiati da gravi lesioni e malattie.

I metodi appena descritti sono stati sviluppati negli ultimi 10 anni e lasciano intravedere un notevole interesse della ricerca scientifica per lo sviluppo di fonti alternative di cellule staminali. Tuttavia sono in fase di studio e di approfondimento i meccanismi molecolari coinvolti nel processo della "riprogrammazione cellulare" in quanto un'esauriente comprensione di questi ultimi potrebbe tradursi nella messa a punto della strategia ottimale per l'ottenimento di iPS su larga scala, con conseguenti applicazioni nell'ambito della medicina rigenerativa.

E' stato recentemente dimostrato [40] che molti processi chimici e numerose molecole sono alla base di varie scoperte ottenute in campo biologico: molto spesso la comprensione di un fenomeno comincia con l'osservazione e poi con la progettazione del modo di perturbarlo. Diversi sono stati i metodi genetici sperimentati per riprogrammare cellule adulte; tuttavia un approccio di tipo chimico potrebbe offrire numerosi vantaggi. Le molecole chimiche generalmente forniscono un elevato grado di controllo temporale sulla funzione delle proteine (inducendone una rapida inibizione o attivazione) ed i loro effetti sono di solito reversibili; gli effetti di queste ultime possono, inoltre, essere finemente regolati variandone la concentrazione ed una singola piccola molecola può essere in grado di modulare contemporaneamente più bersagli specifici all'interno di una famiglia di proteine o tra diverse famiglie di proteine con conseguente possibilità di

produrre il fenotipo cellulare desiderato in modo sinergico. Esempi di piccole molecole che modulano singoli o multipli bersagli cellulari sono: l'acido retinico, gli inibitori delle istoni-deacetilasi e delle protein chinasi, gli analoghi della citidina; tali sostanze chimiche sono state utilizzate per individuare e modulare il fenotipo delle cellule staminali e potrebbero, pertanto, essere utilizzate anche per attuare terapie cellulari di specifiche malattie o di particolari tipologie di tumore.

La nascita avvenuta nel 1997 della pecora Dolly, il primo mammifero clonato mediante trasferimento nucleare di cellule somatiche (SCNT), e la successiva derivazione di ESC da embrioni clonati ha generato molto entusiasmo perché ha introdotto il concetto di "riprogrammazione cellulare". Tale scoperta ha aperto le strade alla possibilità di produrre cellule staminali per la medicina rigenerativa e di sviluppare nuovi studi per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base del differenziamento e del de-differenziamento cellulare.

L'identificazione di molecole di piccole dimensioni capaci di indurre il de-differenziamento di cellule somatiche potrebbe contribuire a chiarire il meccanismo molecolare alla base di tale fenomeno e potrebbe, in ultima analisi, permettere di rigenerare specifici tessuti *in vivo*.

Tra le varie molecole è stato individuato un agente demetilante, la 5-Azacidina, ovvero un analogo della citosina che causa la demetilazione dei residui di 5-metilcitosina, essendo dotato di un atomo di azoto in posizione 5 al posto dell'atomo di carbonio presente sulla citosina nella stessa posizione (Figura 3a).

La metilazione del DNA è un processo biochimico mediante il quale l'enzima DNA-metiltransferasi (DNMT) aggiunge un gruppo metilico alle citosine in posizione 5, quando esse sono seguite da una guanosina (dinucleotide CpG). Le DNMT identificate nelle cellule eucariotiche superiori sono la DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. La prima è coinvolta nella metilazione del DNA neosintetizzato, ed è per questo definita come

metiltransferasi “*di mantenimento*”. Ha affinità per il DNA emi-metilato, legge l’informazione sulla copia “vecchia” dell’elica del DNA e la ripristina sull’elica appena sintetizzata. Le DNMT3a e DNMT3b hanno invece la capacità di aggiungere i gruppi metilici al DNA che non presenta alcuna modifica e sono per questo definite come “*de novo*” metiltransferasi. La citosina metilata diventa così il segnale di riconoscimento per un gruppo di proteine (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 e MBD4) che, legandosi al DNA, ne prevengono la corretta trascrizione e attirano, inoltre, altre DNMT che propagano il processo di metilazione a tutto il locus genico.

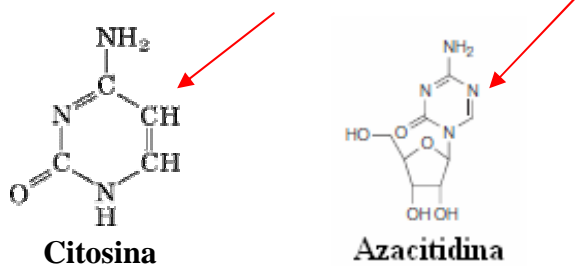
La metilazione del DNA è un adattamento evolutivo per controllare la trascrizione di un genoma di grande complessità come quello degli eucarioti superiori, e quindi anche dei mammiferi. Infatti, solo piccole tracce di DNA metilato sono presenti negli eucarioti inferiori (come i lieviti) e sono completamente assenti nei procarioti. La metilazione del DNA, per esempio, è coinvolta nella regolazione dei geni “imprantati”, nel silenziamento di una copia del cromosoma X nelle donne, nella regolazione dei geni gameto-specifici e tessuto-specifici. Se ad essere “spento” è però un gene importante per la regolazione della proliferazione o per il controllo del differenziamento [41], le normali funzioni cellulari risultano alterate, predisponendo così la cellula alla degenerazione neoplastica, al differenziamento o al de-differenziamento cellulare. Il DNA delle cellule tumorali presenta tracce evidenti di metilazione aberrante, con un generale abbassamento dei livelli globali di metilazione (ipometilazione), ma con delle regioni altamente metilate (ipermetilazione). Recenti studi hanno dimostrato che nelle cellule trasformate le regioni ipermetilate sono di solito i promotori di geni oncosoppressori. Questo fenomeno è alla base dell’utilizzo di vari farmaci in campo oncoematologico: in particolare per la cura delle MDS (Sindromi Mielodisplastiche) viene utilizzata la 5-azacitidina, un agente demetilante capace di modulare l’espressione genica delle cellule tumorali.

Nelle MDS [42], infatti, le cellule tumorali presentano promotori di geni oncosoppressori ipermetilati, con conseguente silenziamento genico ed iperproliferazione cellulare.

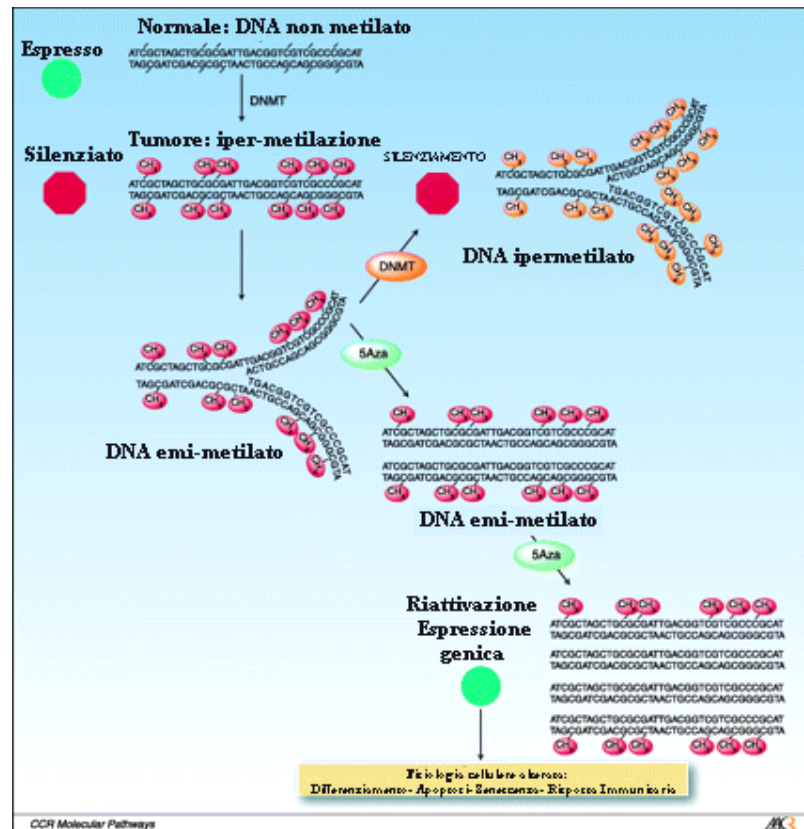
In particolare una famiglia di DNA metiltransferasi (DNMTs) catalizza la metilazione della posizione 5 della citosina (Figura 3b); dopo la conversione intracellulare della 5-azacitidina in 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), l'azacitidina viene incorporata nel DNA al posto della citidina, dove agisce come un inibitore diretto e irreversibile di DNMTs (Figura 3c): l'enzima DNMT metila sia residui di citosina che di 5-azacitidina; quest'ultima cattura, mediante la formazione di un legame covalente, la DNMT portando alla formazione di un prodotto intermedio formato da DNA-Enzima che risulta inattivo [43]. La 5-azacitidina è un nucleoside contenente ribosio, che quindi deve essere convertito in un deossiribonucleoside trifosfato per essere incorporato nel DNA; quindi, dapprima la 5-azacitidina è convertita in deossiribonucleoside trifosfato ed una porzione di essa, non modificata, viene incorporata nell'RNA influenzando su una varietà di funzioni cellulari tra cui la biogenesi dell'RNA ribosomiale [44] con conseguenze intracellulari anche indipendenti dalla demetilazione [45].

Le cellule, dunque, si dividono in assenza di DNMTs, con una conseguente progressiva ipometilazione del DNA e riattivazione dei geni precedentemente silenziati [46].

a)



b)



c)

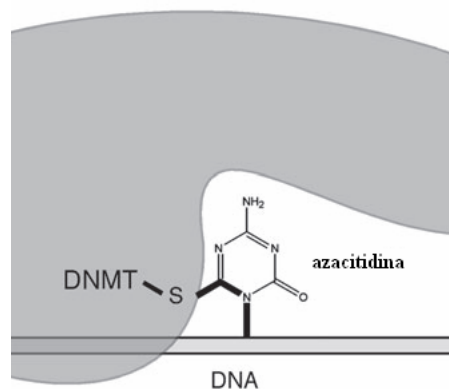


Figura 3.

5-Azacidina, meccanismo d'azione. a) La 5-azacidina è un analogo della citosina poiché presenta un atomo di azoto, N, in posizione 5 piuttosto che un atomo di carbonio (frecche rosse). b) Il promotore di un gene oncosoppressore normalmente non è metilato ed il corrispondente gene risulta espresso; quando si sviluppa un tumore, invece, la DNMT (DNA metiltransferasi) determina la metilazione dello stesso con conseguente silenziamento genico. La 5-azacidina inibisce la DNMT provocando la ri-espressione del gene dopo replicazione cellulare. Tale effetto sull'espressione genica spiega il motivo per cui la 5-azacidina ha conseguenze su molteplici processi cellulari (differenziamento, apoptosi, senescenza, risposta immunitaria). c) La 5-azacidina incorporata nel DNA durante la replicazione è riconosciuta dall'enzima DNMT che resta bloccato per mezzo di un intermedio stabile di reazione formato per mezzo della catena laterale sulfanidrilica di un residuo di cisteina; dalla reazione segue il degrado dell'enzima e la riduzione della concentrazione intracellulare di DNMTs.

Tale meccanismo spiegherebbe dal punto di vista molecolare l'azione sull'espressione genica che numerosi ricercatori hanno attribuito alla 5-azacitidina.

Tomita e i suoi collaboratori [47] hanno dimostrato che cellule mesenchimali staminali trattate con 5-azacitidina acquisiscono la capacità di differenziare in miotubi che esprimono proteine miocardio-specifiche (Troponina I e Miosina cardiaca); è stato dimostrato, inoltre, che la 5-azacitidina può modulare l'espressione genica di ESC murine differenziate in corpi embrioidi e successivamente trattate con l'agente demetilante: nello studio in questione [48] le cellule "demetilate" presentano le caratteristiche tipiche dello stato indifferenziato tra cui la morfologia, l'aumento di espressione di marcatori specifici (SSEA-1), l'attività della fosfatasi alcalina e l'espressione di geni specifici (OCT4, Nanog, and Sox2).

L'azione demetilante della 5-Azacitidina, con conseguente ripristino di multipotenzialità cellulare, è stata ampiamente dimostrata presso la *Metapontum Agrobios* e verificata nelle piante, monocotiledoni (frumento) e dicotiledoni (Pomodoro), brevetto internazionale N° PCT/IB2007/002204.

Pertanto, sulla base di tali evidenze sperimentali, si è deciso di valutare, mediante una sperimentazione *in vitro*, a livello sia cellulare che molecolare, gli effetti dell'agente demetilante 5-Azacitidina sulla capacità di cellule adipose (Figura 4) di retrovertire allo stato indifferenziato e riprogrammarsi, dopo stimolazione adeguata, in senso differenziativo multilineare (osteogenico, condrogenico e miogenico). Tale metodica (brevetto internazionale N° PCT/IB2007/002204) ha lo scopo di proporre una strategia alternativa per la produzione di cellule pluripotenti mediante trattamento chimico e modifica dello stato epigenetico cellulare.

Tali risultati alimentano grandi speranze di ottenere fonti alternative di popolazioni cellulari da destinare alla Medicina rigenerativa. Infatti, la riprogrammazione di una cellula somatica, quale ad esempio un preadipocita, mediante trattamento demetilante,

rappresenterebbe un'importante soluzione al problema della scarsità dei donatori di midollo osseo e consentirebbe di accedere ad una fonte inesauribile di cellule staminali autologhe di facile reperibilità non legate a problemi etici.

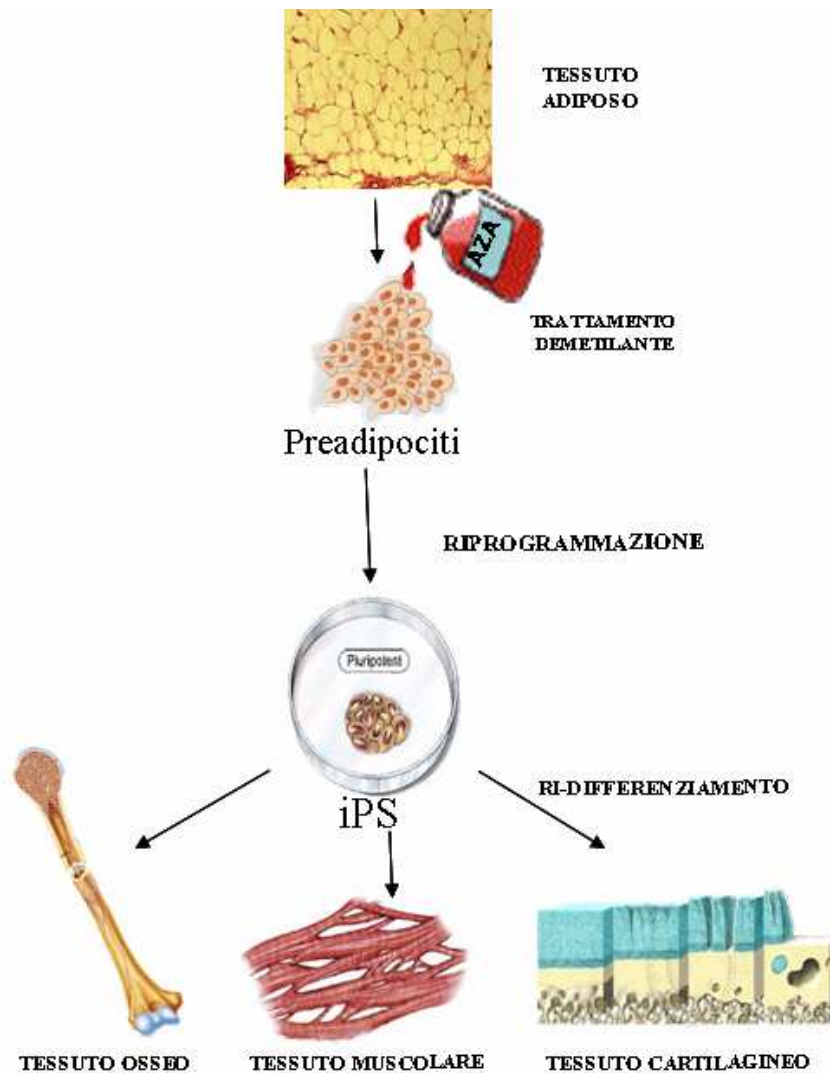


Figura 4.

Produzione di iPS mediante trattamento demetilante. L'ipotesi alla base del lavoro è mostrata in ogni sua fase: preadipociti estratti da soggetto sano sono trattati con l'agente demetilante 5-Azacidina. Scopo dello studio è quello di valutare la capacità di cellule adipose di retrovertire allo stato indifferenziato e di riprogrammarsi, dopo stimolazione adeguata, in senso differenziativo multilineare (osteogenico, condrogenico e miogenico).

MATERIALI E METODI

1. COLTURE CELLULARI

Gli esperimenti presentati in questo lavoro sono stati effettuati su preadipociti estratti da tessuto adiposo di soggetto adulto (37 anni) sottoposto a liposuzione e su preadipociti commerciali acquistati presso la ditta Lonza.

a. Estrazione di preadipociti da tessuto adiposo ottenuto per liposuzione

Il tessuto adiposo è stato lavato 2 volte con PBS+APS al 2% e successivamente digerito con la collagenase 1A (0,1% in terreno di coltura senza antibiotici e siero) in rapporto 1:1, in bagnetto a 37°C per 45 minuti; in seguito l'enzima è stato disattivato con DMEM, 20% FCS e 1% APS, e le cellule sono state filtrate con filtri in tessuto e centrifugate 2 volte a 1.2x1000 rpm per 10min; i preadipociti sono stati, infine, risospesi in DMEM, 20% FCS e 1%APS e seminati in diverse Piastre da 100 X 20 mm.

b. Coltura dei preadipociti

Le cellule commerciali e P0208 sono state coltivate in piastre di polistirene alla densità di $9 \times 10^3/\text{cm}^2$ in terreno PBM-2 (Preadipocyte Basal Medium-2), 10% di FBS, 2mM L-Glutamina 100 unità/ml Penicillina, 100µg/ml Streptomicina (Lonza) in incubatore a 37° C, in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni 3 giorni, mentre le cellule sono state trasferite da una piastra ad un'altra utilizzando tripsina 0.25%, EDTA 0.02 % in PBS.

2. TRATTAMENTO DEI PRADIPOCITI CON 5-AZACITIDINA

Le cellule di generazione 3 sono state seminate alla densità di $9 \times 10^3/\text{cm}^2$ in Piastre da 60 X 15 mm , 100 X 20 mm o 150 X 25 mm ed in piastre per colture cellulari da 6 e da 24 pozzetti. Il terreno di semina era costituito da PBM-2, a cui veniva aggiunto il 10% di FBS (Fetal bovine serum), 2mM L-Glutammina 100 unità/ml Penicillina, 100µg/ml Streptomicina della ditta Lonza.

Dopo 48 ore di coltura in terreno di semina, le cellule sono state divise in 2 sottogruppi identici: il primo coltivato in terreno PBM-2 + 10% di FBS + 2mM L-Glutammina + 100 unità/ml Penicillina e 100µg/ml Streptomicina + 5-azacitidina 10µM per 48-96h; il secondo è stato mantenuto in coltura nello stesso terreno in assenza di 5-azacitidina (terreno di controllo).

Al termine del periodo di incubazione i preadipociti trattati e di controllo sono stati processati secondo i protocolli previsti dalle specifiche metodiche oppure, laddove previsto, sono stati mantenuti in coltura per 1 settimana in PBM-2 + 10% di FBS + 2mM L-Glutammina + 100 unità/ml Penicillina e 100µg/ml Streptomicina e successivamente espansi fino alla generazione 5 utilizzando lo stesso terreno di coltura.

3. VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE

Il 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5 difeniltetrazolo bromuro (MTT) è stato utilizzato per valutare *in vitro* la crescita cellulare.

Il sale di tetrazolo, giallo, viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali a cristalli viola di formazano. Questi sono insolubili e vengono estratti mediante un solvente organico, il propan-2-olo acido (0,04 M HCl in propan-2-olo).

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di $9 \times 10^3/\text{cm}^2$, coltivate nello specifico terreno, aggiunto o meno di azacitidina $10 \mu\text{M}$, per 48-96 ore. Al termine del periodo di incubazione con azacitidina è stato aggiunto terreno di coltura senza siero contenente 10% di soluzione di MTT (5mg/ml) a 37°C per 2,5 ore. In seguito i cristalli di formazano sono stati estratti con isopropanolo acido ($0,04 \text{M}$ HCl) in agitazione per 15 minuti. La lettura dei valori di assorbenza è stata effettuata a 570nm .

4. DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

a. ADIPOGENICO

Il differenziamento è stato indotto dopo 48 h dal raggiungimento della confluenza ed il terreno cambiato ogni 2 giorni. Per le prime 48 ore è stato utilizzato terreno differenziativo in assenza di Isobutilmetilxantina (IBMX). In seguito il terreno privo di IBMX è stato sostituito con terreno differenziativo con IBMX.

Il differenziamento è stato protratto per 3 settimane.

Composizione Terreno differenziativo adipogenico/Controllo

Terreno di differenziamento:

DMEM LG

FBS 10%

APS 1% (Penicillina/Streptomicina)

Insulina 10 µg/ml

Isobutilmetilxantina (IBMX) 0,5 mM

Desametasone 1µM

Indometacina 60 µM

Terreno di controllo:

DMEM LG

FBS 10%

APS 1% (Penicillina/Streptomicina)

b. OSTEOGENICO

Il differenziamento è stato indotto dopo 48 h dal raggiungimento della confluenza ed il terreno cambiato ogni 48 h.

Il differenziamento è stato protratto protratto per 3 settimane.

Composizione Terreno differenziativo osteogenico/Controllo

Terreno di differenziamento:

MEM

FBS 10%

APS 1%

Desametasone 100nM

β-glicerofosfato 10 mM

ac.ascorbico-2-fosfato 0,05 mM

Terreno di controllo:

MEM

FBS 10%

APS 1%

c. CONDROGENICO

Il differenziamento è stato indotto dopo 48 h dal raggiungimento della confluenza ed il terreno cambiato ogni 48 h.

Il differenziamento è stato protratto protratto per 3 settimane.

Composizione Terreno differenziativo condrogenico/Controllo

Terreno di differenziamento:

- STEMPRO Chondrocyte
Differentiation Basal
Medium (Invitrogen)
- STEMPRO Chondrogenesis
Supplement

Terreno di controllo:

STEMPRO Chondrocyte
Differentiation Basal
Medium (Invitrogen)

d. MIOGENICO

Il differenziamento è stato indotto dopo 48 h dal raggiungimento della confluenza ed il terreno cambiato ogni 48 h.

Il differenziamento miogenico è stato suddiviso in due fasi: induzione (prima fase) della durata di 48 h e mantenimento (seconda fase) protratto per 3 settimane.

Composizione Terreno differenziativo miogenico/Controllo

Prima fase:

Terreno di differenziamento:

DMEM HG
FBS 20%
AF 1%
5-Azacidina 10 μ M

Terreno di controllo:

DMEM HG
FBS 20%
AF 1%

Le cellule sono mantenute in tale terreno differenziativo/controllo per 48 h.

Seconda fase:

Terreno di differenziamento:

DMEM HG

FBS 20%

AF 1%

Horse serum 10%

Chick embryo extract 1%

Terreno di controllo:

DMEM HG

FBS 20%

AF 1%

5. COLORAZIONI CITOCHIMICHE

a. OIL RED O

Le cellule sono state fissate con Formalina 3,7% in PBS, lasciate per 1 ora a Temperatura Ambiente e reidratate in acqua di fonte per almeno 15 min. In seguito i campioni sono stati incubati con una soluzione Oil Red (5 mg/ml) diluita 3:2 con acqua distillata per 15 minuti. Dopo un lavaggio con acqua di fonte ed un lavaggio in PBS 1X, le cellule sono state incubate con ematosillina per 8 minuti. In seguito i campioni sono stati lavati due volte in acqua distillata, una volta in acqua di fonte per 1 minuto e montati con montante acquoso Acquavitrex.

b. NILE RED

Le cellule sono state fissate con Formaldeide 3% in PBS per 10 minuti, lavate con PBS ed incubate con una soluzione di Nile Red (2 mg/ml in acetone) 1:1000 in PBS per 10 minuti. In seguito i campioni sono stati lavati velocemente in PBS e montati con montante acquoso + DAPI.

c. ALIZARINA RED

Le cellule sono state fissate con Formalina 3,7% in PBS per 15 minuti a Temperatura Ambiente e lavate 2 volte in H₂O bidistillata. Successivamente i campioni sono stati incubati con 1% Alizarina pH 4.1 per 20 min in agitazione, lavati 4 volte in H₂O bidistillata, nuovamente lasciati in agitazione 5 minuti e montati con montante acquoso.

d. FOSFATASI ALCALINA

Dopo un rapido lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate con Formalina 3,7% in PBS per 10 min a 37°C, lavate velocemente in PBS ed incubate con la soluzione colorante (9,95ml Fast Blue BB salt 0,6mg/ml in tampone Tris/HCl 0,1M pH8,5 + 50µl Naftolo AS-MX fosfato 0,1mg/ml in 0,5% N,N dimetilformammide con 2mM MgCl) per 20min a 37°C al riparo dalla luce. I campioni sono stati, infine, disidratati con alcool 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% e montati con eukitt.

6. ANTICORPI

Per eseguire l'analisi citofluorimetrica sono stati utilizzati i seguenti anticorpi coniugati:

- 1) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD14-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 2) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD34-FITC (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 3) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD44-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 4) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD45-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 5) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD71-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 6) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD90-FITC (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 7) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD105-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.

- 8) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro c-KIT-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 9) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CXCR4-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 10) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro HLA-DR-PE (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.
- 11) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro Integrina β1-FITC (Santa Cruz) concentrato 200µg/ml. Volume d'uso: 10µl/10⁶cellule.

Per eseguire gli esperimenti di immunofluorescenza indiretta sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- 1) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro α-actina (Sigma). Concentrazione d'uso 1:100.
- 2) Anticorpo policlonale di capra diretto contro ADRP (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 3) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro CD34 (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 4) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD105 (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 5) Anticorpo policlonale di capra diretto contro il Collagene di tipo I (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 6) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro Fibroblast Surface Protein (Sigma). Concentrazione d'uso 1:100.
- 7) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro il Fattore di von Willebrand (Sigma). Concentrazione d'uso 1:100.

- 8) Anticorpo policlonale di capra diretto contro GLUT-4 (Santa Cruz Biotechnology).
Concentrazione d'uso 1:100.
- 9) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro Miogenina (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 10) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro Myf 5 (Santa Cruz Biotechnology).
Concentrazione d'uso 1:100.
- 11) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro MyoD (Santa Cruz Biotechnology).
Concentrazione d'uso 1:100.
- 12) Anticorpo policlonale di capra diretto contro Nanog (Santa Cruz Biotechnology).
Concentrazione d'uso 1:100.
- 13) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro OB-R (Santa Cruz Biotechnology).
Concentrazione d'uso 1:100.
- 14) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro OCT-4 (Santa Cruz Biotechnology).
Concentrazione d'uso 1:100.
- 15) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro Osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 16) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro Osteopontina (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 17) Anticorpo policlonale di capra diretto contro Perlecano (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 18) Anticorpo policlonale di capra diretto contro Sox-2 (Santa Cruz Biotechnology).
Concentrazione d'uso è 1:100.
- 19) Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro SREBP-1c (Santa Cruz Biotechnology). Concentrazione d'uso 1:100.
- 20) Anticorpo monoclonale di topo diretto contro Stro-1 (R&D-S MAB)
Concentrazione d'uso 1:100.

Gli anticorpi secondari utilizzati sono:

- 1) Goat Anti-rabbit 594 (Alexa) Concentrazione d'uso 1:200.
- 2) Goat Anti-mouse 594 (Alexa) Concentrazione d'uso 1:200.
- 3) Donkey Anti-goat 594 (Alexa) Concentrazione d'uso 1:200.
- 4) Anticorpo secondario biotinylated pan-specific + Fluoresceina (VECTOR LABORATORIES).

7. ANALISI CITOFUORIMETRICA

Per eseguire l'analisi citofluorimetrica le cellule estratte da tessuto adiposo sono state staccate dalla piastra con tripsina allo 0,25% ed EDTA allo 0,02%, lavate con PBS/BSA al 2%, centrifugate a 1200 rpm per 5 min e risospese in PBS/BSA al 2% in modo da avere 2×10^5 - 1×10^6 cellule in un volume finale di 100 μ l per ciascun campione; esse sono state in seguito incubate al buio per 15 minuti con 10 μ l di anticorpo primario (Ab) coniugato a fluorocromo e risospese in 500 μ l totali di PBS/BSA al 2%; i campioni sono stati caricati su Moflo High Speed Cell Sorter (Dako-Beckmann Coulter); in parallelo sono stati allestiti i campioni di controllo isotipico coniugati a FITC, PE e PE Cy5 (MultiMix Triple-Colour Control Reagent Mouse IgG1/FITC, Mouse IgG1/RPE, Mouse IgG1/RPE-Cy5, DakoCytomation); è stata eseguita l'acquisizione di 50.000 cellule/campione mediante il programma Summit 4.3 (Dako-Beckman Coulter) ed, infine, l'analisi, ovvero la determinazione della fluorescenza specifica di legame di ciascun anticorpo per ciascun campione allestito, è stata effettuata utilizzando la funzione statistica SUBTRACTION del programma Summit 4.3.

8. IMMUNOFLUORESCENZA

Le tecniche di immunofluorescenza sfruttano l'interazione specifica di un anticorpo con il rispettivo antigene al fine di localizzare quest'ultimo o descriverne la distribuzione "in situ" mediante appositi sistemi di rivelazione.

Questa metodica prevede l'impiego di anticorpi in genere ricavati dall'espansione di cellule B in mammiferi (mouse, rabbit, goat, etc...) incubati su preparati di cellule coltivate su vetrini; essi possono essere:

a) MONOCLONALI:

Derivano dall'espansione di un singolo clone linfocitario seguita dalla produzione di una popolazione di plasmacellule secernenti queste particolari immunoglobuline, che presentano la peculiare proprietà di riconoscere un singolo epitopo.

b) POLICLONALI:

Al contrario dei precedenti, gli anticorpi policlonali derivano da più cloni linfocitari con conseguente eterogeneità. Un anticorpo policlonale riconosce differenti epitopi dell'antigene.

Dopo aver trattato le cellule con una serie di reagenti (riportati di seguito), viene impiegato un anticorpo **PRIMARIO** diretto contro la proteina di interesse; successivamente il campione viene incubato con un'altra soluzione contenente l'anticorpo **SECONDARIO** che riconosce l'anticorpo primario.

Gli anticorpi secondari sono marcati con un fluorocromo che emette luce ad una specifica lunghezza d'onda, conferendo una colorazione caratteristica alla preparazione cui sono stati applicati (Figura 5).

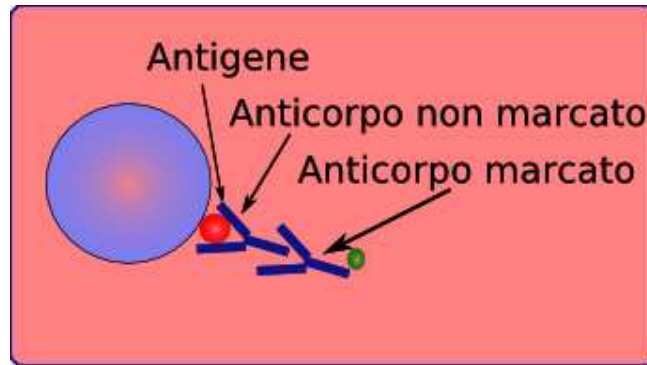


Figura 5.

Riconoscimento antigene-anticorpo alla base della immunofluorescenza indiretta.

L'anticorpo primario (non marcato) riconosce l'antigene di interesse. Successivamente l'anticorpo secondario marcato riconosce il complesso antigene/anticorpo consentendo la rivelazione dell'antigene stesso.

Dal momento che esistono più fluorocromi che emettono luce a differenti lunghezze d'onda (colori), è possibile impiegare filtri selettivi sul microscopio a fluorescenza in modo tale da poter analizzare la stessa sezione tissutale o lo stesso campione cellulare con diversi anticorpi.

La scelta del fluorocromo dipende da una serie di fattori quali:

- a) la sorgente luminosa: lampade al tungsteno, lampade alogene al quarzo o ad arco di mercurio;
- b) il sistema di rilevazione disponibile;
- c) le preferenze o le necessità personali.

L'uso di anticorpi marcati con fluorocromi presenta alcuni vantaggi quali la rapidità e la semplicità d'impiego ed una buona sensibilità. Tra gli svantaggi si ricorda, ad esempio, l'impossibilità di prolungare l'osservazione dello stesso campo del preparato: la fluorescenza, infatti, si affievolisce col passare del tempo soprattutto nel caso di taluni fluorocromi quali la fluoresceina.

E' necessario, inoltre, l'impiego di anticorpi di controllo sia positivi che negativi al fine di verificare la specificità dell'immunocolorazione.

Le cellule sono state seminate su vetrino da 12 mm di diametro, mantenute in coltura a 37°C per 2 o più giorni (in base all'esigenza sperimentale); fissate con Paraformaldeide 4% in PBS (Phosphate Buffered Salt Solution) per 5 minuti a RT (Temperatura ambiente) e lisate con una soluzione 1% di TRITON in acqua per 10 min a RT (solo per antigeni nucleari). I campioni sono stati lasciati in PBS 1X + 10% HS (Horse Serum) per 45 minuti o più a RT, lavati 2 volte con PBS e successivamente incubati con Anticorpo primario diluito in PBS 1X + 3% HS (concentrazione 1:100) per 1 ora a RT oppure overnight a 4°C. Sono stati effettuati 3 lavaggi di 10 minuti in PBS 1X + 3% HS, quindi le cellule sono state incubate con Anticorpo secondario Alexa diluito 1:200 con PBS 1x + 1,5% HS oppure con Anticorpo secondario biotinylated pan-specific per 30 min a RT al buio e successivamente sottoposte a 3 lavaggi di 3 min in PBS 1X. I campioni trattati con Anticorpo secondario biotinylated pan-specific sono stati incubati con Avidin DCS Fluorescein diluito 1:500 in HEPES 10mM, NaCl 0,15 M pH 8,2 per 10 min a RT al buio e lavati 3 volte per 3 minuti in PBS 1X; infine i vetrini sono stati montati con montante acquoso + DAPI. In alternativa è stata effettuata la colorazione dei nuclei con Sytox Green : le cellule sono state incubate con 1µM SYTOX Green in 50 mM Tris pH 7.5 al buio, a RT per 20 minuti ed i vetrini montati con PBS: Glicerolo 1:1.

9. MICROSCOPIA CONFOCALE

Per analizzare i risultati dell'immunofluorescenza è stato utilizzato sia un microscopio a fluorescenza che un microscopio confocale.

Un **Microscopio Confocale** si compone di varie parti (Figura 6):

- a) Sorgente laser
- b) Obiettivo

- c) Specchio diecrico
- d) Diaframma (pinhole)
- e) Fotomoltiplicatore
- f) Computer

A partire da una Sorgente laser, un fascio di luce discreta colpisce una piccolissima area del campione da osservare grazie ad un particolare sistema di *lenti* presenti nell'*obbiettivo*. E' possibile spostare il punto su cui si è concentrata la luce laser attraverso tutto il campo visivo dell'obbiettivo, ottenendo, in tal modo, la scansione di tutto il piano focale.

L'intensità del fascio di luce incidente può essere modulata in modo tale che esso sia sufficiente ad eccitare prevalentemente i fluorocromi che si trovano nel punto di massima concentrazione del raggio, ovvero nel piano di messa a fuoco dell'obbiettivo.

Questo sistema è particolarmente utile in quanto, riducendo l'eccitazione di fluorocromi situati in aree aspecifiche, riduce il "rumore di fondo" e la presenza di aloni.

Dopo che il fascio laser ha colpito il campione, la luce fluorescente che viene da esso emessa, è catturata nuovamente dalle lenti dell'obbiettivo ed indirizzata al fotomoltiplicatore per mezzo di uno *specchio diecrico*.

Dopo aver colpito lo specchio, il fascio luminoso passa attraverso un *diaframma* (detto anche *pinhole*) il quale ha il compito di "ripulire il segnale" dalla luce proveniente dalle zone fuori fuoco illuminate, a loro volta, anche a causa della rifrazione della luce emessa dai fluorocromi eccitati all'interno del campione. In questo modo si impedirà a segnali aspecifici di proseguire e di contribuire alla formazione dell'immagine.

Una volta deviata e corretta, la luce emessa può raggiungere il *fotomoltiplicatore* che funziona rilevando l'intensità luminosa del segnale in arrivo e convertendolo in un segnale elettrico in uscita di intensità proporzionale.

Una volta uscito dal fotomoltiplicatore, il segnale è digitalizzato e successivamente inviato ad un *computer* nel quale è presente un software dedicato all'analisi di campioni per mezzo della microscopia confocale:

- Il software misura l'intensità luminosa punto per punto.
- Ogni punto del campione (e quindi ogni valore d'intensità misurato) corrisponderà ad un pixel sullo schermo che visualizzerà l'immagine.

- Ogni pixel presenterà, a sua volta, un'intensità di colore direttamente proporzionale all'intensità luminosa del punto corrispondente.

- L'immagine finale viene visualizzata mediante uno schermo: essa sarà il risultato dell'accostamento di tutti i pixel ovvero di tutti i punti colpiti dal fascio laser.

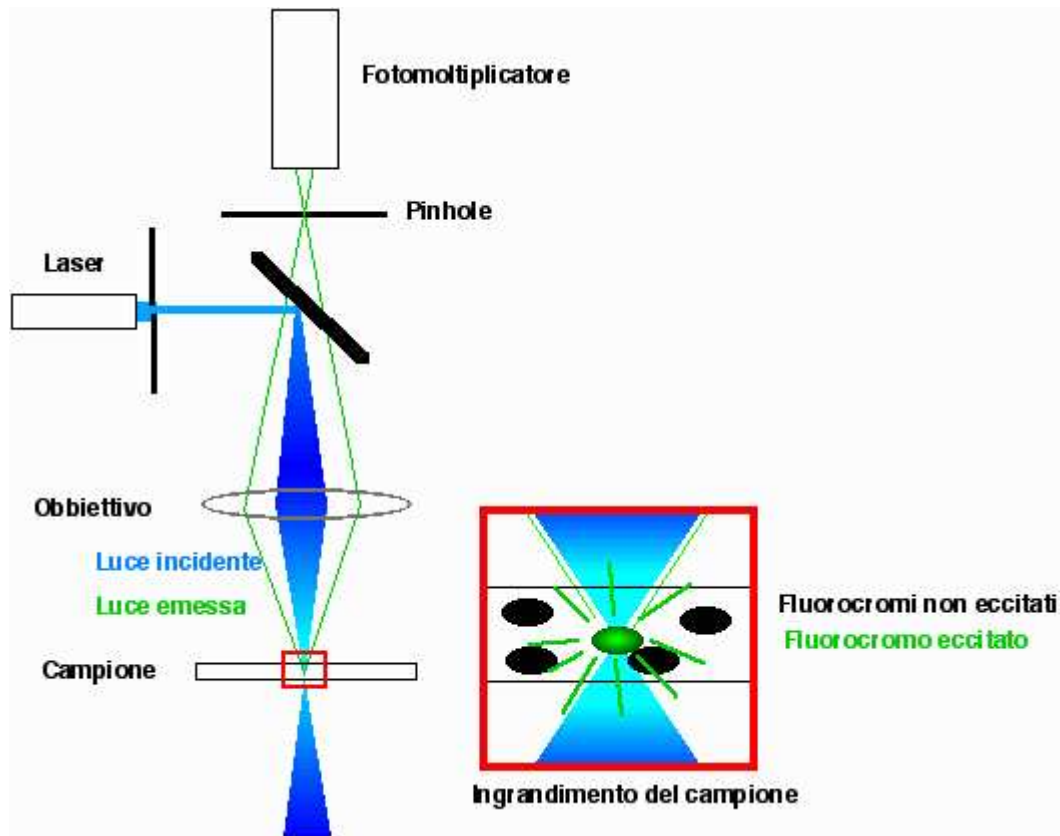


Figura 6.

Principio di funzionamento di un microscopio confocale. A partire da una sorgente laser, un fascio di luce discreta colpisce una piccolissima area del campione da osservare grazie ad un particolare sistema di *lenti* presenti nell'*obbiettivo*. Dopo che il fascio laser ha colpito il campione, la luce fluorescente che viene da esso emessa, è catturata nuovamente dalle lenti dell'obbiettivo ed indirizzata al fotomoltiplicatore per mezzo di uno *specchio dicroico*. Da qui il fascio di luce attraversa un *diaframma* (o *pinhole*), giunge al *fotomoltiplicatore* e, dunque, ad un *computer* che lo analizza.

Il microscopio confocale presenta una serie di altre nuove funzioni rispetto ai microscopi tradizionali:

1) Ricostruzione di un'**immagine tridimensionale**:

vengono analizzati piani focali sempre più profondi all'interno del campione mediante una serie di scansioni successive ottenute dallo spostamento del campione stesso lungo l'asse verticale.

Il software è capace di sovrapporre precisamente tutte le scansioni risultanti (definite *Sezioni Ottiche*) in modo da mettere insieme in un'unica immagine tutti i piani focali e costruire un volume tridimensionale del soggetto in esame (Figura 7).

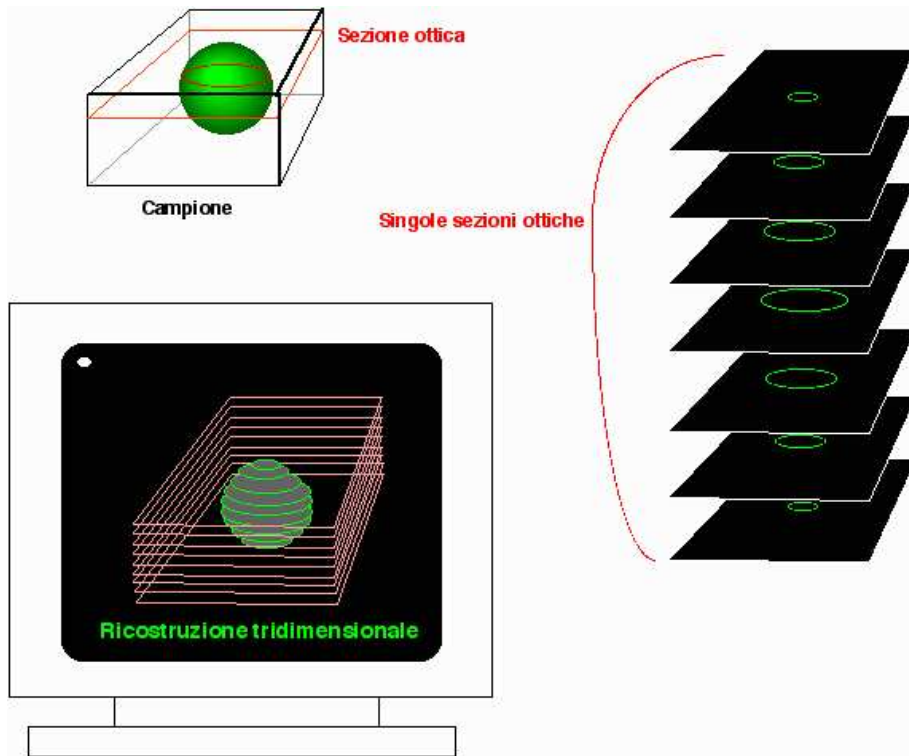


Figura 7.
Ricostruzione tridimensionale di un'immagine al microscopio confocale.

2) Una volta ottenuta l'immagine tridimensionale, il software conserva i dati relativi ad ogni sezione ottica e ad ogni singolo pixel contenuto in essa.

In tal modo è, dunque, possibile modificare le caratteristiche dell'immagine realizzata (colore, contrasto, etc..) ed ottenere la *rotazione virtuale* dell'oggetto tridimensionale ricostruito mediante la scansione.

3) E' possibile inoltre ottenere una visualizzazione immediata della profondità del volume costruito, usando le opzioni che consentono di produrre immagini sotto forma di *stereocoppie* e *anaglifi*.

- 4) Soltanto i software più complessi possono creare un modello virtuale delle superfici tridimensionali del soggetto in esame; mediante questa sofisticata opzione risulta possibile, di conseguenza, eseguire analisi morfologiche o migliorare la veste grafica dell'immagine con effetti di ombreggiatura.
- 5) E', infine, possibile eseguire misurazioni attendibili dei soggetti presi in esame (stereologia) utilizzando le dimensioni dei singoli pixel e lo spessore delle sezioni ottiche.

I risultati degli esperimenti presentati in questo lavoro sono stati ottenuti con l'uso del microscopio confocale Leica TCS SP5 dotato di un obiettivo ad immersione 63X. Le acquisizioni presentate hanno risoluzioni pari a 1024x1024.

10. REAL TIME PCR

Lo studio della variazione dell'espressione genica prevede 4 fasi:

- 1) Estrazione dell'mRNA da campioni cellulari trattati e di controllo;
- 2) Retrotrascrizione dell'mRNA estratto;
- 3) Real Time PCR;
- 4) Analisi dei risultati mediante Metodo del ΔCt (Quantizzazione Relativa).

La metodica in oggetto combina, dunque, la PCR Real-Time con la PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR) allo scopo di quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce, infatti, DNA complementare

a singolo filamento detto cDNA (complementary DNA) mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA.

In questo modo è stato possibile perciò misurare l'espressione relativa di determinati geni in cellule trattate con azacitidina 10µM rispetto a cellule di controllo non trattate. La combinazione di queste due tecniche è denominata ***RT-PCR quantitativa***.

L'mRNA è stato estratto e retrotrascritto a cDNA e sottoposto a Real Time PCR dai Preadipociti secondo i protocolli di seguito riportati.

Estrazione mRNA (RNAqueous Kit, AMBION)

Le cellule sono state seminate in piastre di polistirene e trattate/differenziate secondo le esigenze sperimentali; dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state raccolte in 500 µl di PBS mediante l'uso di uno Scraper; quindi i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti e poi a 4000 rpm per 3 minuti. In seguito le cellule sono state lisate in 700 µl di Lysis/Binding Solution e centrifugate a 14000 rpm per 3 minuti. Quindi sono stati aggiunti 700 µl di Etanolo al 64%, si è mescolato per inversione, filtrato in eppendorf di raccolta e centrifugato a 14000 rpm per 30 secondi. Successivamente l'RNA è stato lavato con 700 µl di Wash solution 1 e poi centrifugato a 14000 rpm per 30 secondi, nuovamente lavato con 500 µl di Wash solution 2/3 e centrifugato a 14000 rpm per 30 secondi (2 lavaggi); dopo aver centrifugato a vuoto a 14000 rpm per 30 secondi, l'RNA è stato eluito con 80 µl di Elution Solution (pre-riscaldato a 75°C) dopo aver centrifugato a 14000 rpm per 30 secondi. 10 µl di RNA sono stati analizzati in gel di Agarosio al 2% e quantificati utilizzando il Lambda DNA (BioLabs), ossia DNA a doppio filamento isolato da batteriofago Lambda a concentrazione nota (pari a 500 µg/ ml).

Retrotrascrizione (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR)

L'RNA delle cellule trattate e di controllo è stato selezionato e quantizzato utilizzando il Lambda DNA. In seguito è stata allestita la reazione di retrotrascrizione utilizzando per ciascun campione i reagenti nelle quantità e nelle modalità indicate dal kit (10 µl di 2X RT Reaction Mix, 2 µl di RT Enzyme Mix, RNA fino ad 1 µg, DEPC-treated water fino a 20 µl); dopo aver aggiunto µl (2U) di E.Coli RNase H seguito da incubazione a 37°C per 20 minuti.

Real Time PCR

L'evoluzione della classica PCR è rappresentata dalla PCR Real Time che permette contemporaneamente l'amplificazione e il rilevamento dell'amplificato.

La Real Time misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale. Questo è reso possibile mediante il rilevamento di una fluorescenza che è proporzionale al prodotto di PCR; tale fluorescenza, durante ogni ciclo di amplificazione, può essere rilevata utilizzando dei marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR. In questo caso non viene eseguita la corsa su gel d'agarosio e l'analisi del prodotto di fluorescenza avviene tramite software gestito da un computer. Tramite questa tecnica è possibile la quantificazione dell'espressione genica, l'identificazione del prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici, l'analisi simultanea di due campioni nella stessa reazione e l'individuazione di mutazioni puntiformi.

I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle molecole fluorescenti che si intercalano con il DNA a doppio filamento (per esempio ***SYBR Green***) oppure oligonucleotidi fluorescenti, denominati sonde, che si ibridizzano con il DNA (le più

utilizzate sono le sonde *TaqMan*, le sonde per *FRET*, i *molecular beacon* e gli *scorpions primer*).

Il ***SYBR Green*** è una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA. All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, i primer e la molecola fluorescente. Dopo l'annealing dei primer, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica e durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone, cioè dei prodotti della PCR. La molecola fluorescente, non essendo specifica, si lega in modo random a tutte le doppie eliche inclusi dimeri di primer ed eventuali prodotti aspecifici. Tuttavia, considerato che il SYBR Green non fluoresce in assenza di DNA a doppia elica, se dopo l'amplificazione i campioni vengono riscaldati e viene registrata la variazione della fluorescenza al variare della temperatura, si può generare una curva di dissociazione (detta *Curva di Melting*), caratteristica di ogni prodotto di amplificazione. Più precisamente viene definita la temperatura di melting (*T_m*) come la temperatura alla quale la metà del DNA si trova nello stato a doppia elica e la metà in quello denaturato. La *T_m* dipende sia dalla lunghezza totale della molecola di DNA sia dalla specifica sequenza dei nucleotidi; a ogni prodotto di PCR corrisponde pertanto una *T_m* caratteristica.

I vantaggi della Real Time rispetto alla PCR classica sono molteplici:

- la maggiore sensibilità (può testare con affidabilità fino a 0,5 picogrammi di DNA) e specificità (dovuta all'appaiamento specifico dei primer e della sonda all'interno dell'amplicone);
- la possibilità di monitorare la reazione di PCR mentre questa si verifica e registrare l'emissione della fluorescenza durante la reazione;
- permette di acquisire un dato quantitativo con un ampio range (10^1 - 10^7 copie);

- riduzione dei tempi di analisi e dei rischi di contaminazione, in quanto al termine della reazione di amplificazione non è richiesta elettroforesi o altra manipolazione.

Gli esperimenti di Real Time PCR sono stati effettuati secondo la seguente modalità: dopo aver slesstita la reazione di Real Time PCR utilizzando lo strumento 7500 Fast Real-Time PCR System ed i reagenti nelle quantità e nelle modalità indicate dal kit per ciascun campione (25 μ l di SYBR Green qPCR SuperMix for ABI PRISM, 1 μ l (200 nM) di Forward primer 10 μ M, 1 μ l (200 nM) di Reverse primer 10 μ M, fino a 5 μ l cDNA e fino a 50 μ l di Acqua distillata autoclavata); i campioni sono stati, quindi, incubati a 50°C per 2 minuti, a 95°C per 10 minuti e per 40 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 60 secondi. Infine è stata e dopo l'amplificazione i campioni sono stati riscaldati ed è stata registrata la variazione della fluorescenza al variare della temperatura, è stata, pertanto, generata una curva di dissociazione per ogni prodotto di amplificazione incubando i campioni

I dati relativi all'espressione del gene sono stati raccolti in termini di Ct (ciclo soglia) ed analizzati utilizzando il metodo del Δ Ct ovvero mediante quantificazione relativa con cui è possibile valutare se un determinato gene è più o meno espresso in due diverse situazioni sperimentali (per esempio in una coltura cellulare di preadipociti prima e dopo il trattamento con 5-azacitidina).

Questa quantificazione viene effettuata paragonando i Ct delle due situazioni sperimentali e normalizzando l'espressione del gene studiato con lo studio contemporaneo dell'espressione di un gene *housekeeping*, ossia un gene che viene costitutivamente espresso da una cellula a livelli medio-alti (nel caso specifico il gene dell'actina β) la cui espressione è costante e non influenzata dal trattamento in studio. In particolare i Ct dei geni studiati vengono riportati al gene housekeeping calcolando il Δ Ct (delta Ct) per eliminare la variabilità dovuta al fatto di avere più o meno cDNA nel campione.

I due ΔCt ottenuti da ciascuna situazione sperimentale (campione di controllo e campione trattato) vengono poi utilizzati per calcolare il $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct) mentre la variazione di espressione genica (“Fold-expression changes”) si calcola utilizzando l’equazione:

$$x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

dove se $x > 1$ il gene target è sovraespresso, se $x < 1$ è sottoespresso.

La sequenza dei primers utilizzati in questo studio è stata riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Sequenza dei primers utilizzati in Real Time PCR.

ACT β -For	GGCATCCTCACCTGAAGTA
ACT β -Rev	AGGTGTGGTGCCAGATTTTC
ADRP-For	GAGATGGCAGAGAACGGTGT
ADRP-Rev	AGCCCCTTACAGGCATAGGT
Aggrecano-For	ACTTCCGCTGGTCAGATGGA
Aggregano-Rev	TCTCGTGCCAGATCATCACC
AlkalinePhosphatase-For	TGGAACATTCTGGATCTGAC
AlkalinePhosphatase-Rev	GAGTGAGTGAGTGAGCAAGG
CD105-For	CACTAGCCAGGTCTCGAAGG
CD105-Rev	CCCGTTGGGA ACTCTAGGA
CD14-For	GCTGGACGATGAAGATTTCC
CD14-Rev	GGCATGGATCTCCACCTCTA
CD29-For	AACCAACCGTAGCAAAGGAA
CD29-Rev	CCCCTGATCTTAATCGCAA
CD31-For	CCCGAAGGCAGAACTA ACTG
CD31-Rev	CAGAAGGGTCAGCAGGACTC
CD34-For	AGCCAACGTTTCAACTCCAG
CD34-Rev	GAGATGTTGCAAGGCTAGTGC
CD44-For	CGATATCCCTCATGCCATCT
CD44-Rev	AAGCACAATCCAGGCAACTC
CD45-For	TGCAAAACTCAACCCTACCC
CD45-Rev	GTGGTTGTCAATGGGGAAAC
CD90-For	CTAGTGGACCAGAGCCTTCG
CD90-Rev	GCACGTGCTTCTTTGTCTCA
CDKN2A-For	ATATGCCTTCCCCACTACC
CDKN2A-Rev	GCAGAAGCGGTGTTTTTCTT
CEBP α -For	TGGACAAGAACAGCAACGAG
CEBP α -Rev	CCATGGCCTTGACCAAGGAG
CEBP β -For	AGAAGACCGTGGACAAGCA
CEBP β -Rev	GCTTGAACAAGTTCCGCAGG
CEBP δ -For	AGAAGTTGGTGGAGCTGTCG
CEBP δ -Rev	GGTATGGGTCGTTGCTGAGT
GLUT4-For	GCTACCTCTACATCATCCAGAATCTC
GLUT4-Rev	CCAGAAACATCGGCCCA
Leptina-For	TCTTGTGGCTTTGGCCCTATCT
Leptina-Rev	CCAGTGTCTGGTCCATCTTGGATA
LipoproteinLipasi-For	ACTGGTGGGACAGGATGTGG
LipoproteinLipasi-Rev	CCGTTCTGCATACTCAAAGTTAGG
Miogenina-For	GTGGCCTTCCCAGATGAAAC
Miogenina-Rev	CCGGCTTGGGAAGACAATCTC
Myf5-For	TTCTACGACGGCTCCTGCATA
Myf5-Rev	CCACTCGCGGCACAAACT

MyoD-For	GCAGGTGTAACCGTAACC
MyoD-Rev	ACGTACAAATTCCCTGTAGC
NANOGcdr-For	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC
NANOGcdr-Rev	ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC
NANOGcdrUtr-For	TTTGGGAAGCTGCTGGGGAAG
NANOGcdrUtr-Rev	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA
OB-For	ACCCCATCCTGACCTTATCC
OB-Rev	CCAGGTCGTTGGATATTTGG
OCT4-For	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG
OCT4-Rev	ACTTCACCTTCCCTCCAACC
Osteopontina-For	AGGAGGAGGCAGAGCACA
Osteopontina-Rev	CTGGTATGGCACAGGTGATG
Osterix-For	GCCAGAAGCTGTGAAACCTC
Osterix-Rev	GCTGCAAGCTCTCCATAACC
Perlecano-For	TGGCTGACAGCATCTCAGGA
Perlecano-Rev	CGATGGAGCGAGTGAAATTCA
Runx2-For	GCCTTCAAGGTGGTAGCCC
Runx2-Rev	CGTTACCCGCCATGACAGTA
SOX2-For	CCTCCGGGACATGATCAG
SOX2-Rev	TTCTCCCCCTCCAGTTC
Sox9-For	CCCCAACAGATCGCCTACAG
Sox9-Rev	GAGTTCTGGTCGGTGTAGTC
VWF-For	TCGGACCCTTATGACTTTGC
VWF-Rev	TTTCCCCAGAGGAGATGTTG

11. WESTERN BLOTTING

a. Preparazione dei lisati cellulari

Sono stati raccolti preadipociti di generazione 3 trattati con azacitidina per 96 ore e cellule di generazione 5 espanse dopo il trattamento (vedi paragrafo Trattamento dei preadipociti con 5-azacitidina).

Per la preparazione degli estratti cellulari le cellule sono state seminate su piastre da 100 X 20 mm alla densità di 9×10^3 cell/cm² ed al termine del periodo di trattamento sono state lavate per 3 volte con PBS 1X a 4°C, trasferite in eppendorf da 1,5ml e quindi centrifugate per 5 minuti a 1200 rpm a 4°C. Dopo aver rimosso il surnatante, al precipitato sono stati aggiunti 120ul di buffer di lisi (1% v/v Triton-X100, 0.5% p/v

Sodio Desossicolato, 0,15M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.6, 1% cocktail di inibitori di proteasi (Sigma –Aldrich)) e si è spipettato il campione con siringa da insulina con ago da 29G; successivamente il campione è stato ricentrifugato 14000 rpm 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato quindi raccolto per la successiva quantificazione.

b. Quantificazione degli estratti cellulari

Per quantificare le proteine presenti negli estratti cellulari è stato utilizzato il BCA Protein Assay kit (Pierce) che sfrutta il metodo colorimetrico dell'Acido Bicinconinico. Le soluzioni del kit, A (Na₂CO₃, NaHCO₃, Tartrato di Sodio, Acido Bicinconinico in una soluzione 0,1M di NaOH) e B (soluzione al 4% di Cu₂SO₄), vengono miscelate in proporzione 50:1 rispettivamente per un volume finale di 1 ml. E' stata preparata una curva di taratura tramite l'utilizzo di campioni standard a concentrazione nota di albumina sierica bovina (BSA) costruendo 8 punti da 0ug/μl a 2000 μg/ul. Standard e campioni sono stati quindi aggiunti in volume di 50μl alla miscela di reattivi A+B e dopo agitazione per 30 secondi sono stati incubati 30 minuti a 37°C. Dopo raffreddamento è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 562nm.

c. Sodio Dodecil Solfato Poliacrilamide Gel Elettroforesi (SDS-PAGE)

Dopo quantificazione gli estratti proteici sono stati separati mediante SDS-PAGE e sono stati caricati 50μg di campione. I campioni sono stati ridotti mediante l'aggiunta di una soluzione contenente: 50nM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glicerolo, 5% β-Mercaptoetanol, 0,03% Blu di Bromofenolo e successiva ebollizione a 96°C per 5 minuti. Un volume totale di 20 μl è stato caricato in gel di poliacrilamide discontinuo costituito da 10 ml di gel Staking (4% Soluzione Acrilamide/bis-Acrilamide 37:1, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 100 μl Ammonio persolfato (APS), 16 μl TEMED

(Sigma Aldrich)) e 20 ml di gel Running (10% Soluzione Acrilamide/bis-Acrilamide 37:1, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 70 ul APS, 15 ul TEMED), colato e montato su cella per elettroforesi VP-140 (Elettrofor). I campioni sono stati sottoposti ad una corrente di 60 mA ad Ampere costante per 2 ore e 30 minuti in tampone di corsa costituito da: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0,03% SDS. Dopo la separazione mediante corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (GE Amersham) con porosità 0,45 um precedentemente idratata con acqua mQ ed equilibrata in tampone di traferimento 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0,03% SDS, 20% Metanolo per 15 minuti. Successivamente è stato assemblato l'apparato per il trasferimento che ha previsto la generazione di un campo elettrico costante ortogonale al gel di 400 mA per un tempo che poteva andare da 90 a 240 minuti a seconda dell'analita di interesse.

d. Immunoblotting

La proteina NANOG è stata rivelata incubando la membrana di nitrocellulosa per 1 ora con soluzione al 5% di latte scremato in TBS-T (Tris HCl pH 7.6, NaCl, 0,1% Tween) a temperatura ambiente. Il giorno seguente la membrana è stata posta a contatto con una soluzione di anticorpo anti NANOG (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:1000 in una soluzione al 1% di latte scremato a temperatura ambiente per 1 ora e 30 minuti. Dopo aver eseguito un lavaggio da 15 minuti con TBS-T ne sono seguiti altri 3 da 5 minuti, al termine la membrana è stata posta in incubazione per 1 ora con anticorpo secondario anti goat-HRP (GE Amersham) 1:25000. Dopo l'incubazione è stato eseguito un lavaggio da 15 minuti con TBS-T a cui ne sono seguiti altri 3 da 5 minuti.

e. Rivelazione

Per la rivelazione è stato seguito il protocollo fornito dal kit ECL (GE Amersham) che prevede l'incubazione per 1 minuto della membrana con 0,125ml/cm² di soluzione di rivelazione costituita dalle soluzioni A e B in proporzione 1:1. Una volta asciugata, la membrana è stata posta in cella di esposizione, al buio, e posta a contatto con una lastra autoradiografica (GE Amersham) per un tempo da 1 a 30 minuti. Successivamente la lastra impressionata è stata sviluppata tramite incubazione in liquido di sviluppo X-OMAT EX II e di fissaggio RP X-OMAT LO (Kodak).

RISULTATI

1. MODELLI CELLULARI DISTINTI DI PREADIPOCITI SONO COMPARABILI

Allo scopo di studiare l'eventuale ri-modulazione del fenotipo adiposo dopo trattamento demetilante con azacitidina, abbiamo utilizzato 2 popolazioni cellulari di preadipociti ottenuti da volontari sani, ovvero:

- Preadipociti estratti da lipoaspirato (che nel lavoro chiameremo P0208);
- Preadipociti commerciali estratti da tessuto adiposo sottocutaneo.

In una prima fase i preadipociti sono stati coltivati su vetrino per 48h e successivamente tali cellule sono state sottoposte ad uno studio di caratterizzazione fenotipica e molecolare allo scopo di valutare se entrambi i modelli mostrassero le medesime caratteristiche e fossero adatti ai nostri scopi.

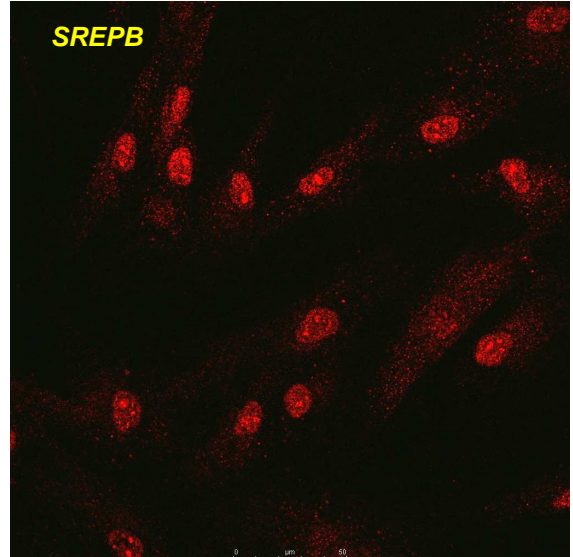
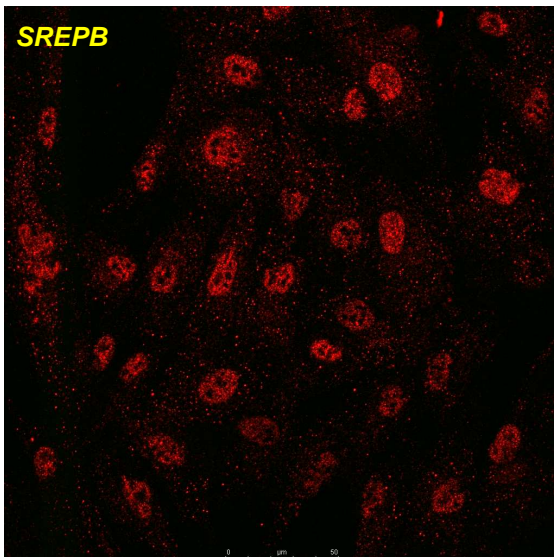
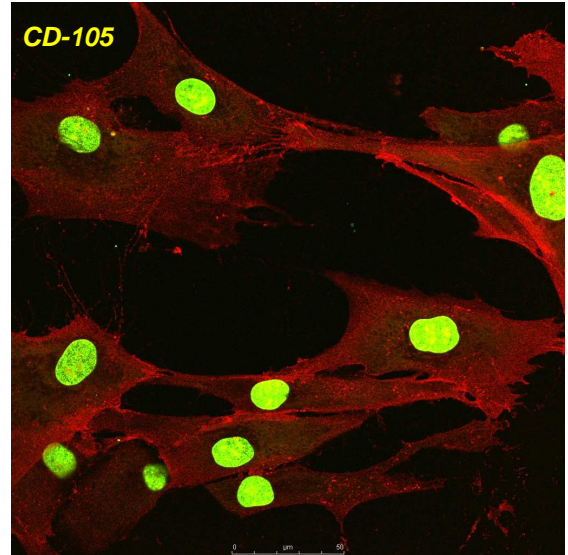
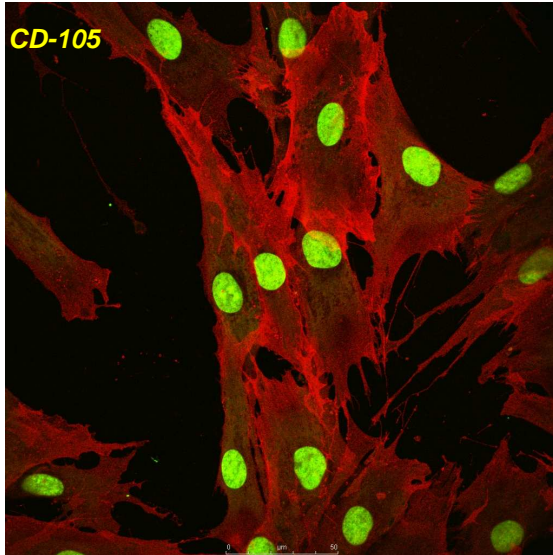
Sono stati, pertanto, eseguiti saggi citochimici per la valutazione dell'espressione di marcatori specifici (immunofluorescenza indiretta, analisi citofluorimetrica) e per la caratterizzazione del contenuto di lipidi intracellulari (Oil Red O).

Le immagini acquisite al microscopio confocale (Figura 8), hanno evidenziato che i preadipociti P0208 e quelli commerciali di terza generazione esprimevano gli stessi marcatori, ovvero erano entrambi positivi per CD 105, Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) e Fattore di fattore di von Willebrand e negativi per altri marcatori normalmente espressi in cellule staminali embrionali (OCT-4, Nanog, Sox-2), cellule staminali mesenchimali (Stro-1), adipociti maturi (ADRP o Adipose differentiation-related protein, GLUT-4, OB-R o Recettore della Leptina), fibroblasti (Fibroblast Surface Protein), cellule ematiche (CD 34) e cellule muscolari lisce (α -

actina). La popolazione di preadipociti commerciali presentava, infine, il Collagene di tipo I che non era presente nella popolazione estratta nel nostro laboratorio.

Preadipociti P0208

Preadipociti commerciali



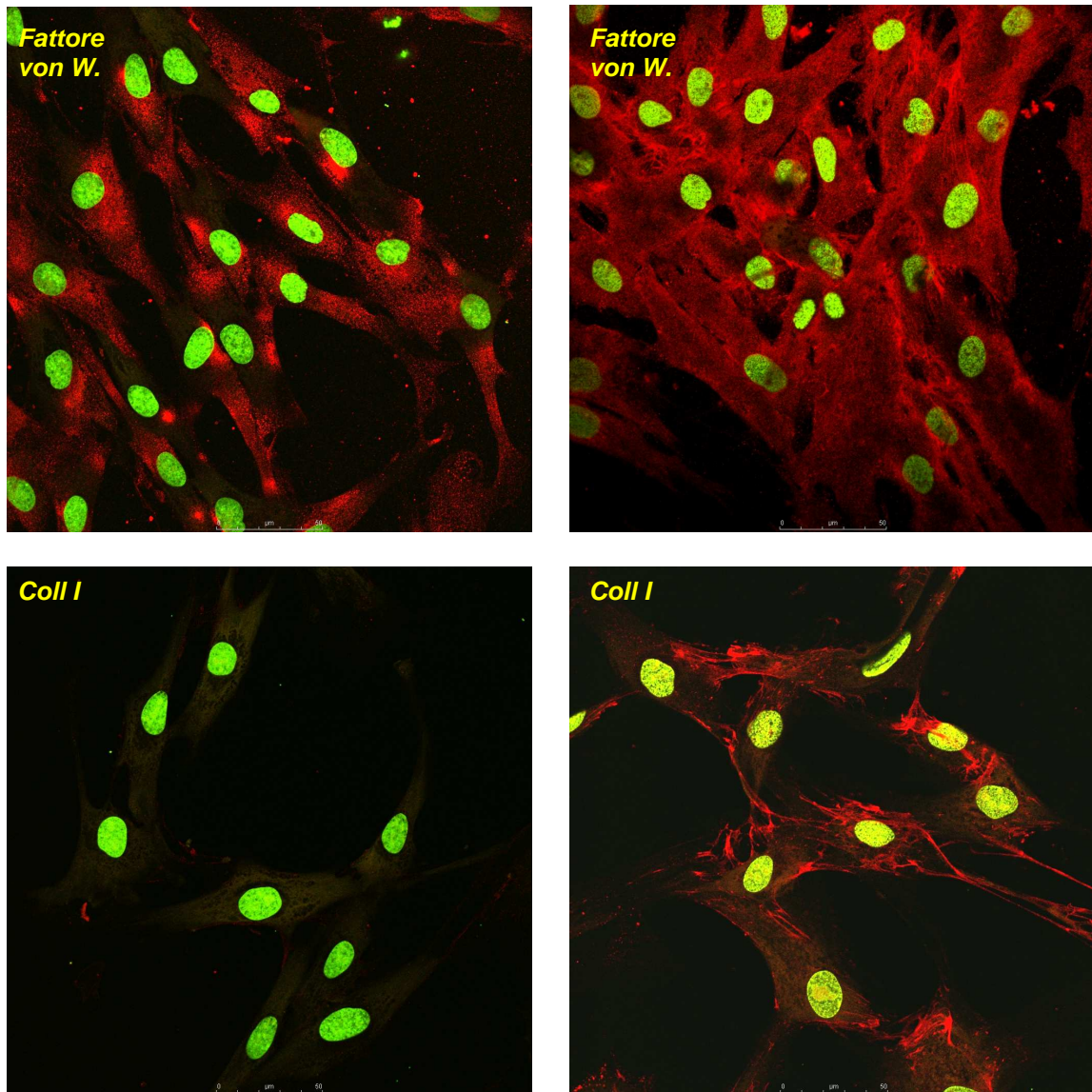


Figura 8.

Marcatori espressi in preadipociti P0208 e commerciali. I preadipociti (estratti e commerciali) sono stati coltivati su vetrino per 48 ore. Entrambe le popolazioni mostrano i marcatori CD105, SREBP e Fattore di von Willebrand (rosso) e solo i preadipociti commerciali sono risultati positivi al Collagene di tipo I. I nuclei sono colorati con Sytox green (verde) e le immagini sono state acquisite con un obiettivo 63X. Barra 50 μm.

Allo stesso scopo è stata eseguita mediante microscopia ottica l'analisi della morfologia cellulare (Figura 9-a) e successivamente la colorazione dei lipidi intracitoplasmatici con Oil Red O (Figura 9-b); da tali indagini è emerso che entrambe le popolazioni presentano morfologia di tipo fibroblastoide e lipidi distribuiti in sede citoplasmatica.

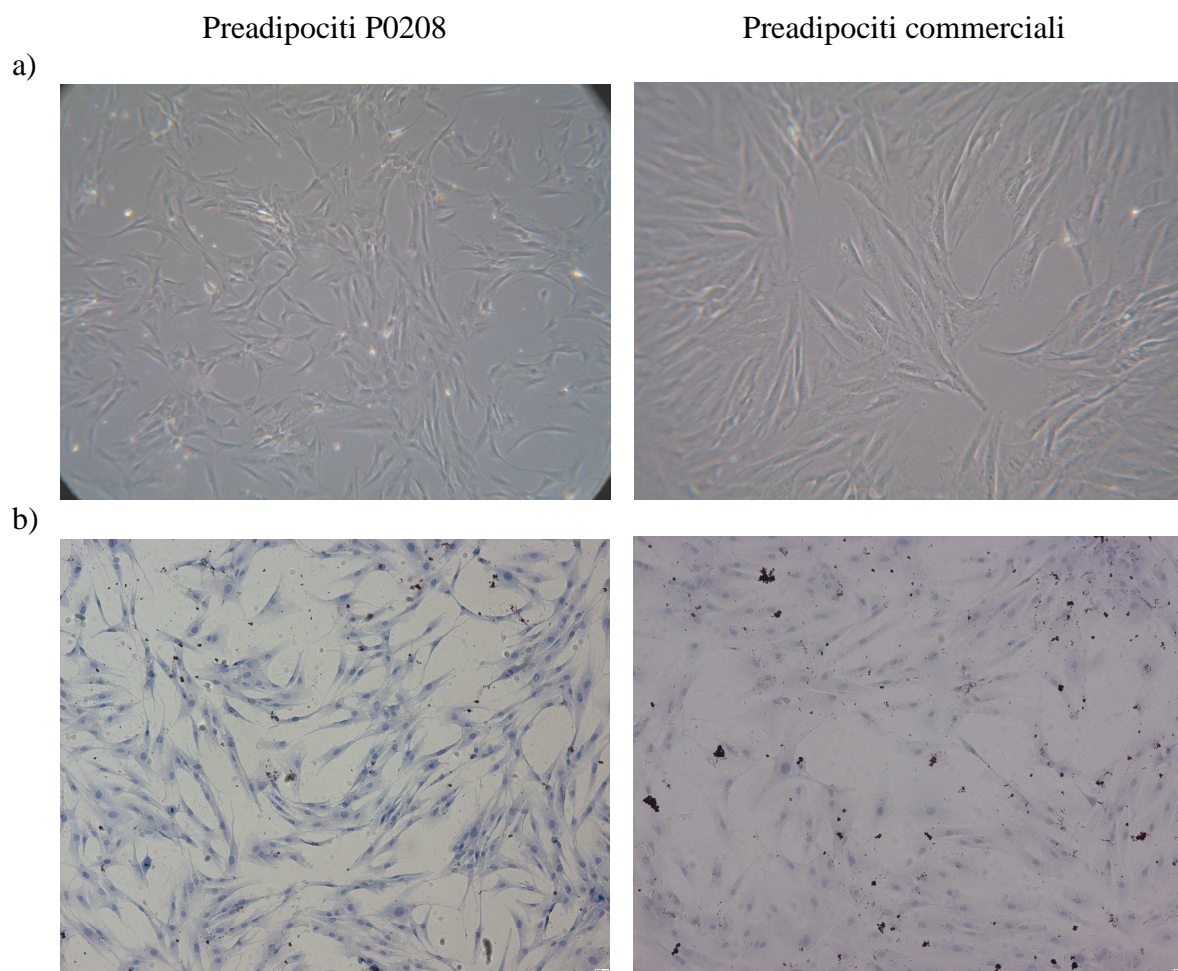


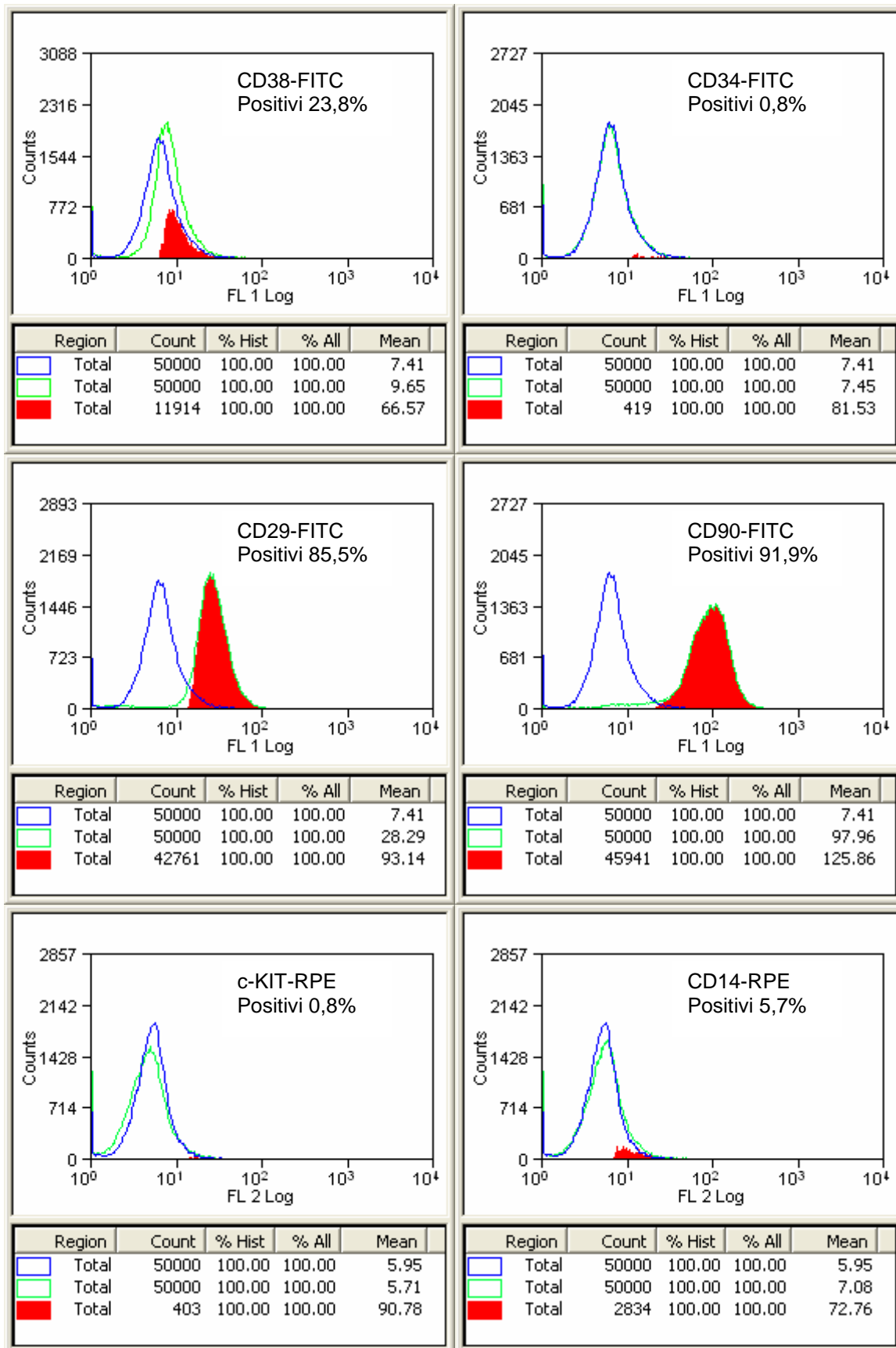
Figura 9.

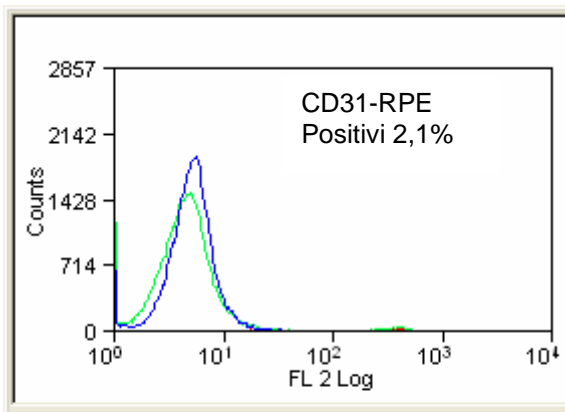
Analisi morfologica dei preadipociti P0208 e commerciali. Microscopia a contrasto di fase (a) di colture di preadipociti (estratti e commerciali) coltivati su vetrino per 48 ore, e colorazione con Oil Red O (b). Entrambe le popolazioni mostrano morfologia fibroblastoide e vacuoli lipidici intracitoplasmatici (rosso). I nuclei sono colorati con ematossilina (blu) e le immagini sono state acquisite con un obiettivo 10X. Barra 100 μm .

Tramite analisi citofluorimetrica è stata valutata la percentuale di espressione di vari marcatori sulla popolazione di preadipociti P0208 (Figura 10-a) e commerciali (Figura 10-b): CD-14, CD-29, CD-31, CD-34, CD-38, CD-44, CD-45, CD-71, CD-90, CD-105, c-kit, CXCR4, HLA-DR.

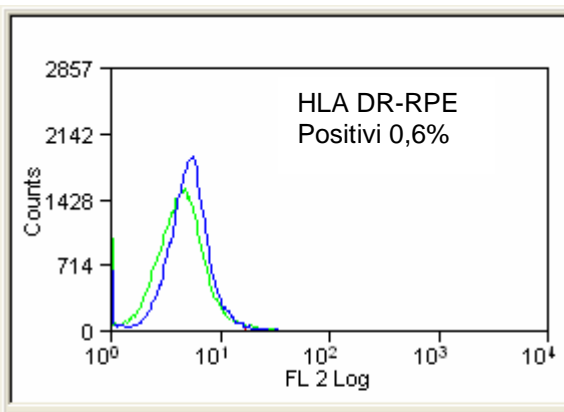
Tali marcatori risultavano essere espressi in varia percentuale nelle 2 popolazioni cellulari che risultavano essere omogenee per quanto riguarda il CD29, CD 90 ed il CD105 (vedi anche Figura 8), ovvero i principali marcatori mesenchimali descritti in letteratura [49].

a)

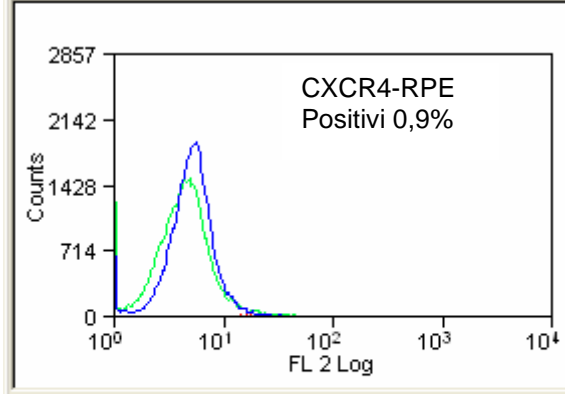




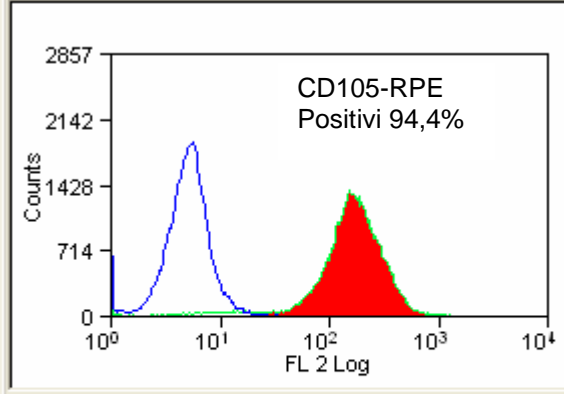
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	5.95
█ Total	50000	100.00	100.00	10.72
█ Total	1028	100.00	100.00	143.05



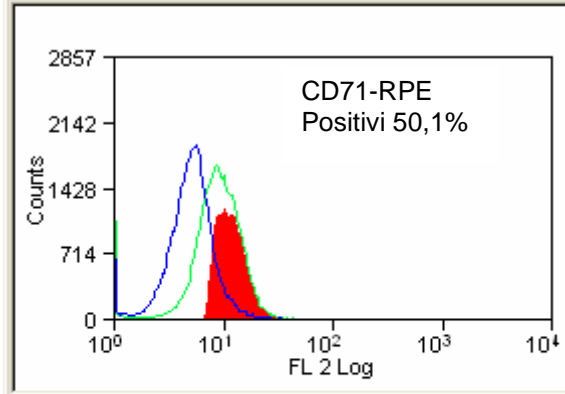
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	5.95
█ Total	50000	100.00	100.00	5.36
█ Total	299	100.00	100.00	99.76



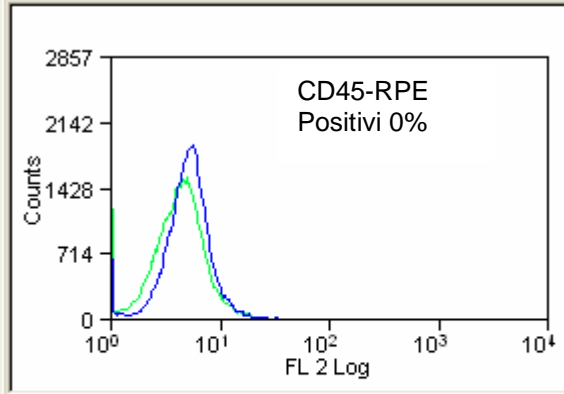
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	5.95
█ Total	50000	100.00	100.00	5.46
█ Total	464	100.00	100.00	92.81



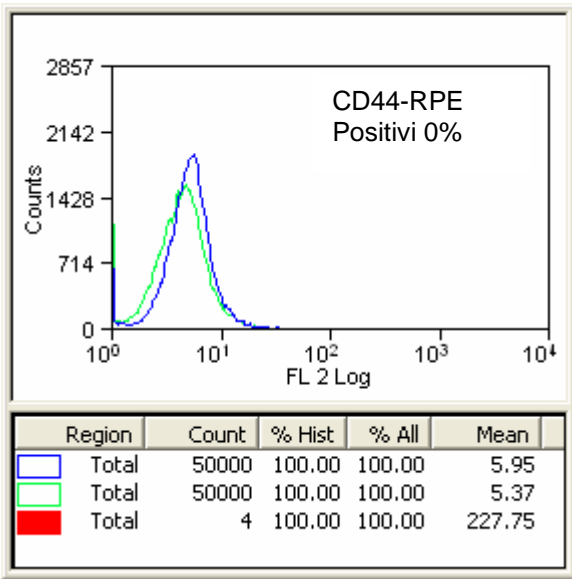
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	5.95
█ Total	50000	100.00	100.00	194.39
█ Total	47207	100.00	100.00	142.66



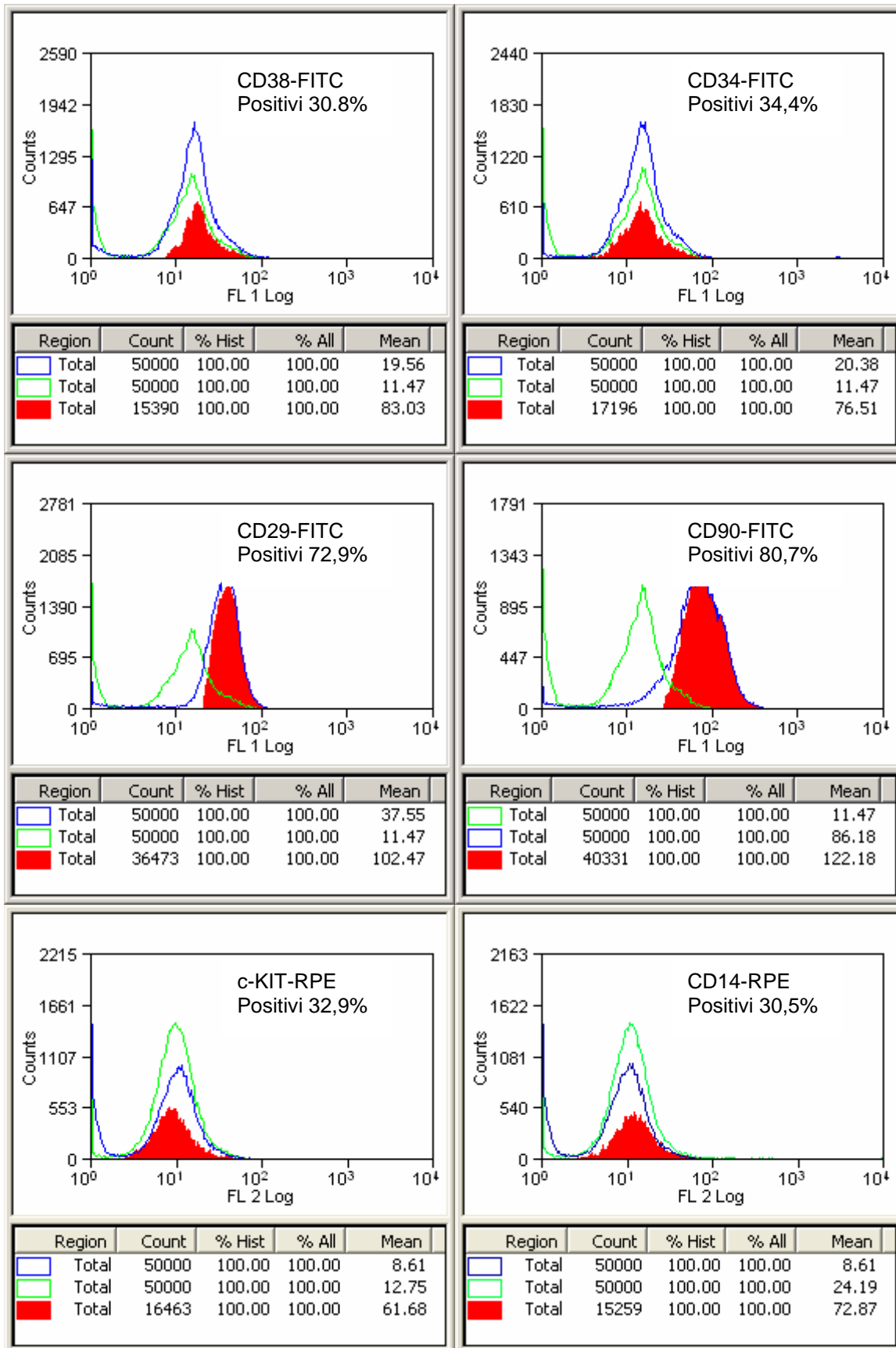
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	5.95
█ Total	50000	100.00	100.00	10.08
█ Total	25043	100.00	100.00	68.56

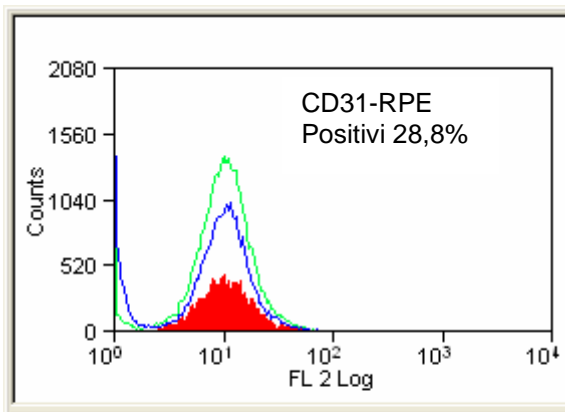


Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	5.95
█ Total	50000	100.00	100.00	4.99
█ Total	0	0.00	0.00	0.00

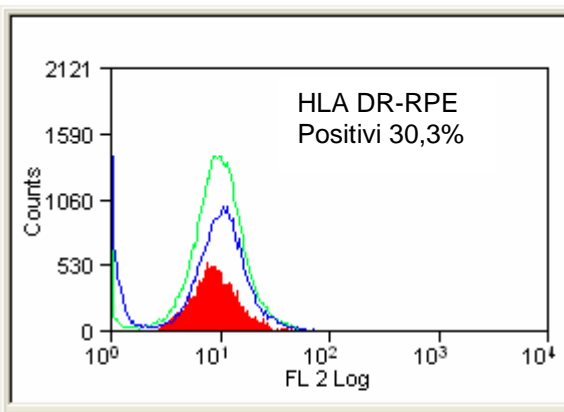


b)

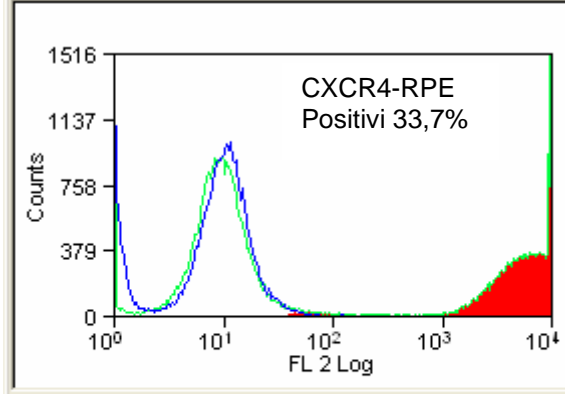




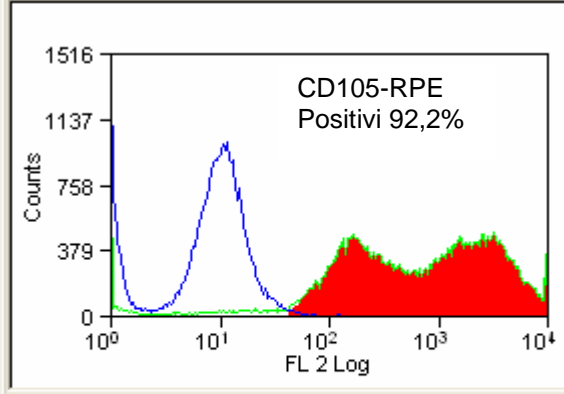
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	8.61
█ Total	50000	100.00	100.00	12.38
█ Total	14396	100.00	100.00	65.67



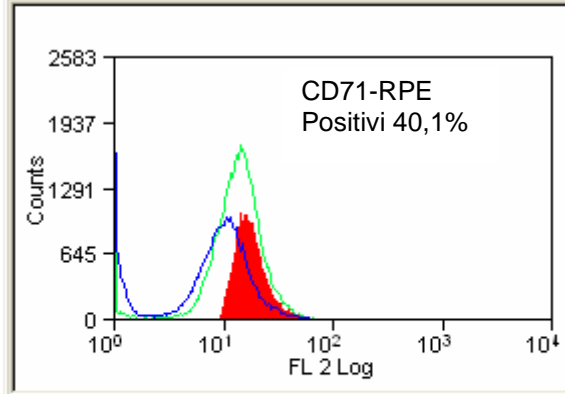
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	8.61
█ Total	50000	100.00	100.00	10.89
█ Total	15137	100.00	100.00	60.76



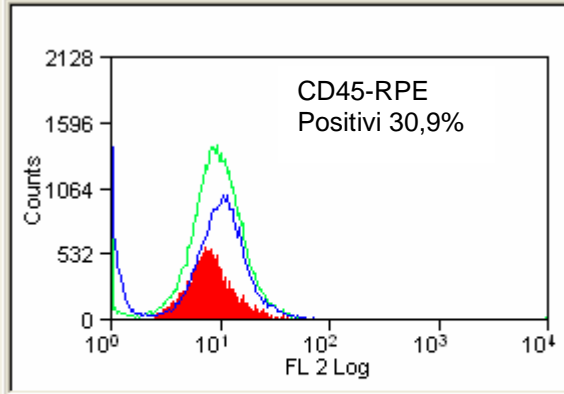
Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	8.61
█ Total	50000	100.00	100.00	1999.65
█ Total	16833	100.00	100.00	233.58



Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	8.61
█ Total	50000	100.00	100.00	1592.22
█ Total	46089	100.00	100.00	183.80



Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	8.61
█ Total	50000	100.00	100.00	16.11
█ Total	20049	100.00	100.00	79.95



Region	Count	% Hist	% All	Mean
█ Total	50000	100.00	100.00	8.61
█ Total	50000	100.00	100.00	16.79
█ Total	15451	100.00	100.00	58.78

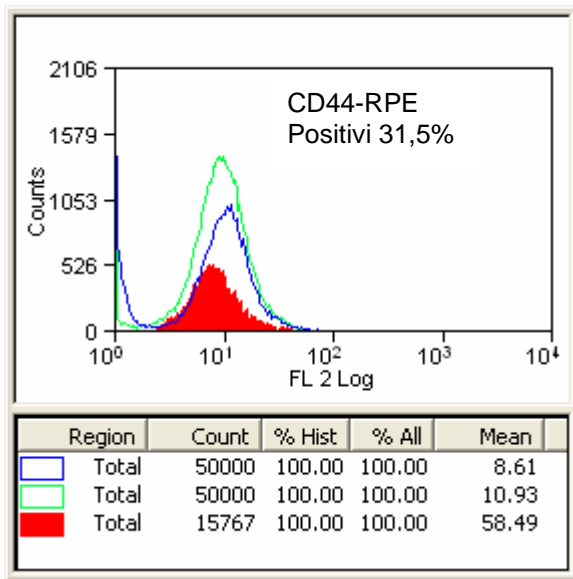


Figura 10.

Analisi citofluorimetrica di preadipociti P0208 e commerciali. I preadipociti P0208 (a) e commerciali (b) sono stati coltivati su plastica per 48 ore e sottoposti ad analisi citofluorimetrica. Entrambe le popolazioni risultavano essere omogenee per quanto riguarda il CD29, CD 90 ed il CD105, i principali marcatori mesenchimali. L'indagine è stata effettuata considerando 50.000 eventi/cellule per marcatore.

Questi risultati suggeriscono che la popolazione di preadipociti estratta nel nostro laboratorio era paragonabile a quella commerciale e che entrambe erano idonee per lo studio presentato in questa tesi.

2. LA 5-AZACITIDINA NON ESERCITA UN'AZIONE CITOTOSSICA SUI PREADIPOCITI

Le popolazioni cellulari utilizzate per gli esperimenti sono state sottoposte a studio della vitalità *in vitro* mediante saggio di 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-[1]-2,5 difeniltetrazolo bromuro (MTT). Il *saggio di valutazione della vitalità cellulare in vitro* viene effettuato mediante incubazione delle cellule con il sale di tetrazolo (giallo) per 2,5 ore; durante questo periodo le deidrogenasi mitocondriali riducono il suddetto sale a cristalli viola di formazano che vengono successivamente estratti dalle cellule e solubilizzati in isopropanolo acido.

La lettura dei valori di assorbanza a 570nm (OD, densità ottica) è correlata alla vitalità cellulare.

I dati riportati in Figura 11 dimostrano che ***il trattamento con azacitidina 10 μ M per 96h non influisce negativamente sulla vitalità cellulare, ovvero non è citotossico***; i valori di assorbanza relativi alle cellule trattate erano paragonabili a quelli di controllo a tutti i tempi analizzati: al termine dei 4 giorni di incubazione (t4), dopo una settimana di coltura in terreno proliferativo (t4 + 1 sett.) e nelle 2 generazioni successive (G.4-G.5).

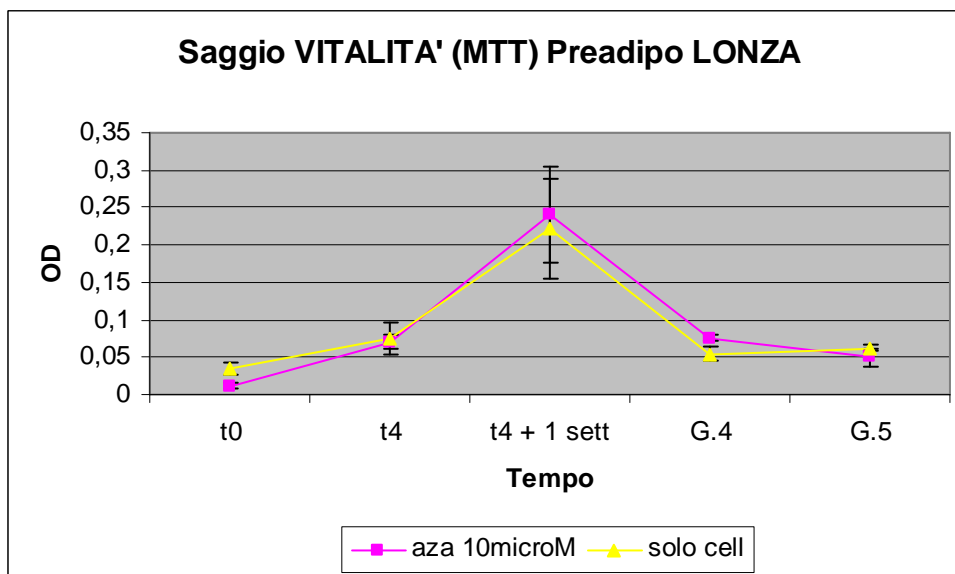


Figura 11.

Saggio di valutazione della vitalità cellulare *in vitro* (MTT). Preadipociti commerciali di terza generazione, trattati con azacitidina 10 μM per 4 giorni (t4), mantenuti in coltura per 1 settimana (t4 + 1 sett.) ed espansi dopo trattamento fino alla quarta (G.4) e alla quinta (G.5) generazione; a tutti i tempi considerati la 5-azacitidina non ha un effetto citotossico sulle cellule, ovvero la popolazione trattata con azacitidina (fucsia) presenta valori di densità ottica (OD) simili a quelli di controllo (giallo).

3. LA DEMETILAZIONE DETERMINA LA SOVRA-ESPRESSIONE DEI GENI OCT-4, NANOG E SOX-2

Sono state successivamente studiate le caratteristiche fenotipiche e genetiche dei preadipociti di terza generazione esposti alla 5-azacitidina 10 μ M secondo una precisa tempistica che è riportata nello schema sottostante:

- 1) Trattamento con azacitidina 10 μ M di 48 ore (**T2**);
- 2) Trattamento con azacitidina 10 μ M di 48 ore (**T2**) + 6 giorni di coltura (per favorire l'espansione di eventuali nuclei di cellule "riprogrammate");
- 3) Trattamento con azacitidina 10 μ M di 48 ore (**T2**) + 6 giorni di coltura + distacco ed espansione delle cellule fino alla generazione 5 (allo scopo di promuovere la selezione di cellule eventualmente "riprogrammate").
- 4) Trattamento con azacitidina 10 μ M di 96 ore (**T4**);
- 5) Trattamento con azacitidina 10 μ M di 96 ore (**T4**) + 6 giorni di coltura;
- 6) Trattamento con azacitidina 10 μ M di 96 ore (**T4**) + 6 giorni di coltura in piastra + distacco ed espansione delle cellule fino alla generazione 5.

Al termine di ciascuna incubazione i campioni sono sottoposti ad una serie di indagini citochimiche e molecolari allo scopo di verificare l'eventuale ri-modulazione del genotipo/fenotipo adiposo dopo trattamento; oggetto di studio sono stati i geni riportati in Tabella 2 e caratterizzanti il fenotipo adiposo e staminale.

Tabella 2. Geni studiati per la caratterizzazione dei Preadipociti mediante Real Time PCR.

	Organi- simo	Nome Gene	Identifi- cativo Data- base Gene NCBI	Nome proteina	Localizza- zione cromoso- mica	Gene in bp	mRNA in bp	Regione Codificante CDS in bp	Proteina
1)	<i>Homo sapiens</i>	ADRP ADFP	123 NC_000 009.10	adipose differentia- tion- related protein	9p22.1	11815 bp	1980	1314	438aa
2)	<i>Homo sapiens</i>	CD14	929 NC_000 005	CD14 antigen	5q31.1	1939 bp	Iso1 : 1513 Iso2:16 06	1127 1127	375aa 375aa
3)	<i>Homo sapiens</i>	CD29, ITGB1	3688 NC_000 010.9	integrin beta 1	10p11.2	57879 bp	Isof1A: 3701 Isof1C- 1:2516 Isof1C- 2:2498 Isof1D:2 481 Isof1A:2 533 Isof1B:3 388	2396 2480 2462 2408 2397 2372	799aa 826aa 820aa 802aa 799aa 790aa
4)	<i>Homo sapiens</i>	CD31 PECAM1	5175 NC_000 017.9	platelet/en- dothelial cell adhesion molecule	17q23	63582 bp	2948	1989	662aa
5)	<i>Homo sapiens</i>	CD34	947 NC- 000001. 9	CD34 antigen	1q32	24801 bp	Isofb :2 811 Isofa :2 616	987 1158	329aa 386aa
6)	<i>Homo sapiens</i>	CD44	960 NC_000 011.8	CD44 antigen	11p13	93533 bp	Isof1 :5 732 Isof2 :5 603 Isof3 :4 985 Isof4 :4 589 Isof5 :3 969	2229 2091 1482 1086 420	743aa 700aa 494aa 362aa 140aa
7)	<i>Homo sapiens</i>	CD45 PTPRC	5788 NC_000	protein tyrosine	1q31-q32	118106 bp	Isof1p : 5027	3915 3771	1035aa 1257aa

			001.9	phosphatase, receptor type, C			Isof3p: 4883 Isof2p: 4544 Isof4:1 019	3432 105	1144aa 35aa
8)	<i>Homo sapiens</i>	CD90 THY1	234 NC_00011.8	Thy-1 cell surface antigen	11q22.3-q23	4967 bp	1791	485	161aa
9)	<i>Homo sapiens</i>	CD105 ENG	2022 NM_000009.10	endoglin	9q33-q34.1	39691 bp	3130	1878	626aa
10)	<i>Homo sapiens</i>	CDKN2A	1029 NC_000009.1	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	9p21	26740 bp	Isof4:1 151 Isof3:1 434 Isof1:1 160	522 351 471	174aa 117aa 157aa
11)	<i>Homo sapiens</i>	NANOG	79923 NC_000012.10	homeobox transcription factor Nanog	12p13.31	6661 bp	2098	918	306aa
12)	<i>Homo sapiens</i>	OB LEP	3952 NC_000007.12	leptin	7q31.3	16351 bp	3426	504	167aa
13)	<i>Homo sapiens</i>	OCT4 POU5F1	5460 NC_000006.1	POU domain, class 5, transcription factor 1	6p21.31	6326 bp	Iosf1:1 389 Isof2:1 149	1083 855	361aa 165aa
14)	<i>Homo sapiens</i>	Runx2	860 NC_000006	runt-related transcription factor 2	6p21	222766 bp	Isofa:55 53 Isofb:5 487 Isofc:57 01	1566 1500 1524	522aa 500aa 508aa
15)	<i>Homo sapiens</i>	SOX2	6657 NC_000003.1	SRY (sex determining region Y)-box 2	3q26.3-q27	2503 bp	2503	954	318aa
16)	<i>Homo sapiens</i>	VWF	7450 NC_000012	von Willebrand factor	12p13.3	175797 bp	8833	8441	2813aa

Dall'analisi dei dati ottenuti, si è osservato che il trattamento con azacitidina 10 μ M modifica l'espressione genica di entrambe le popolazioni di preadipociti: *i geni marcatori di staminalità (OCT-4, NANOG, SOX2) risultano, infatti, UP regolati dopo trattamento demetilante di 48-96h.*

La Figura 12 mostra i risultati degli esperimenti di Real Time PCR relativi alla popolazione di preadipociti commerciali. La Figura 13 è relativa ai preadipociti P0208.

NANOG-cdr/NANOG-cdrUTR si riferiscono allo stesso gene NANOG amplificato mediante 2 distinte coppie di primers disegnate su 2 diverse regioni del gene. Convenzionalmente i geni UP sono rappresentati in rosso, i geni DOWN in verde e quelli invariati rispetto al controllo in grigio.

Gli studi relativi ai geni OCT-4, NANOG, SOX2. sono stati successivamente integrati con l'analisi di espressione dei seguenti marcatori: ADRP, CD 14, CD 29, CD 31, CD 34, CD 44, CD 90, CD 105, CDKN2A, OB, RUNX2, VWF.

- ***Preadipociti commerciali:***

Dalla quantizzazione genica relativa riportata in Figura 12-a appare evidente che 48h di trattamento demetilante non sono sufficienti a produrre una UP regolazione dei geni OCT-4, NANOG, SOX2.

L'effetto registrato al tempo T2 non esclude, tuttavia, che il farmaco abbia avuto effetto poiché, protraendo la coltura cellulare per 6 giorni in terreno proliferativo, si osserva quanto riportato in Figura 12-b, ovvero la UP regolazione dei geni OCT4, NANOG e SOX2.

I risultati riportati in Figura 12-c mostrano che l'espansione della coltura fino alla generazione 5 non modifica in modo significativo l'espressione genica; permane, infatti, la sovraespressione dei geni NANOG-cdrUTR e SOX2 nelle cellule trattate; i livelli di OCT4 e NANOG-cdr sono, inoltre, prossimi al valore 1 (controllo) in entrambi i casi

riportati in Figura 12b-c e quindi, pur essendo convenzionalmente rappresentati con colorazioni diverse, potrebbero in realtà riprodurre la medesima situazione.

E' possibile pertanto formulare l'ipotesi che il trattamento dei preadipociti commerciali con azacitidina 10 μ M determina variazioni geniche che si conservano nel tempo anche dopo sub-coltura (distacchi con tripsina seguiti da coltura delle generazioni successive) delle cellule trattate.

Il prolungamento dell'incubazione con azacitidina 10 μ M di ulteriori 48h (periodo totale di trattamento di 96h, T4) produce effetti decisamente apprezzabili: si verifica, a questo tempo, un notevole incremento dell'espressione dei geni marcatori OCT-4, NANOG, SOX2 (Figura 12-d).

Dall'analisi dei dati presentati in Figura 12-e, si osserva che la coltura di 6 giorni successiva al trattamento T4 influisce in modo negativo sull'espressione dei geni considerati; tale effetto potrebbe essere determinato dal raggiungimento della *confluenza cellulare* che attiverebbe fenomeni di differenziamento con conseguente perdita della eventuale pluripotenza acquisita (si noti anche in Figura 14-e la UP regolazione della gran parte degli altri geni analizzati); pertanto **si può ipotizzare che 10 giorni di coltura totale (4 + 6) oltre a non essere utili alla produzione di cellule potenzialmente pluripotenti, risultano alterare il pattern di espressione tipico della popolazione cellulare.** Tale fenomeno risulta tuttavia *transitorio*, ovvero risolvibile mediante distacco e sub-coltura delle cellule (Figura 12-f).

La Figura 12-f rappresenta il profilo di espressione genica dei preadipociti sub-coltivati fino alla 5 generazione dopo trattamento; come si può osservare dal confronto con la Figura 12-d, gli effetti prodotti dall'azacitidina al tempo T4 (aumento del livello di espressione dei marcatori di staminalità) sono riscontrabili anche nella popolazione espansa fino a 2 generazioni successive (generazione 5).

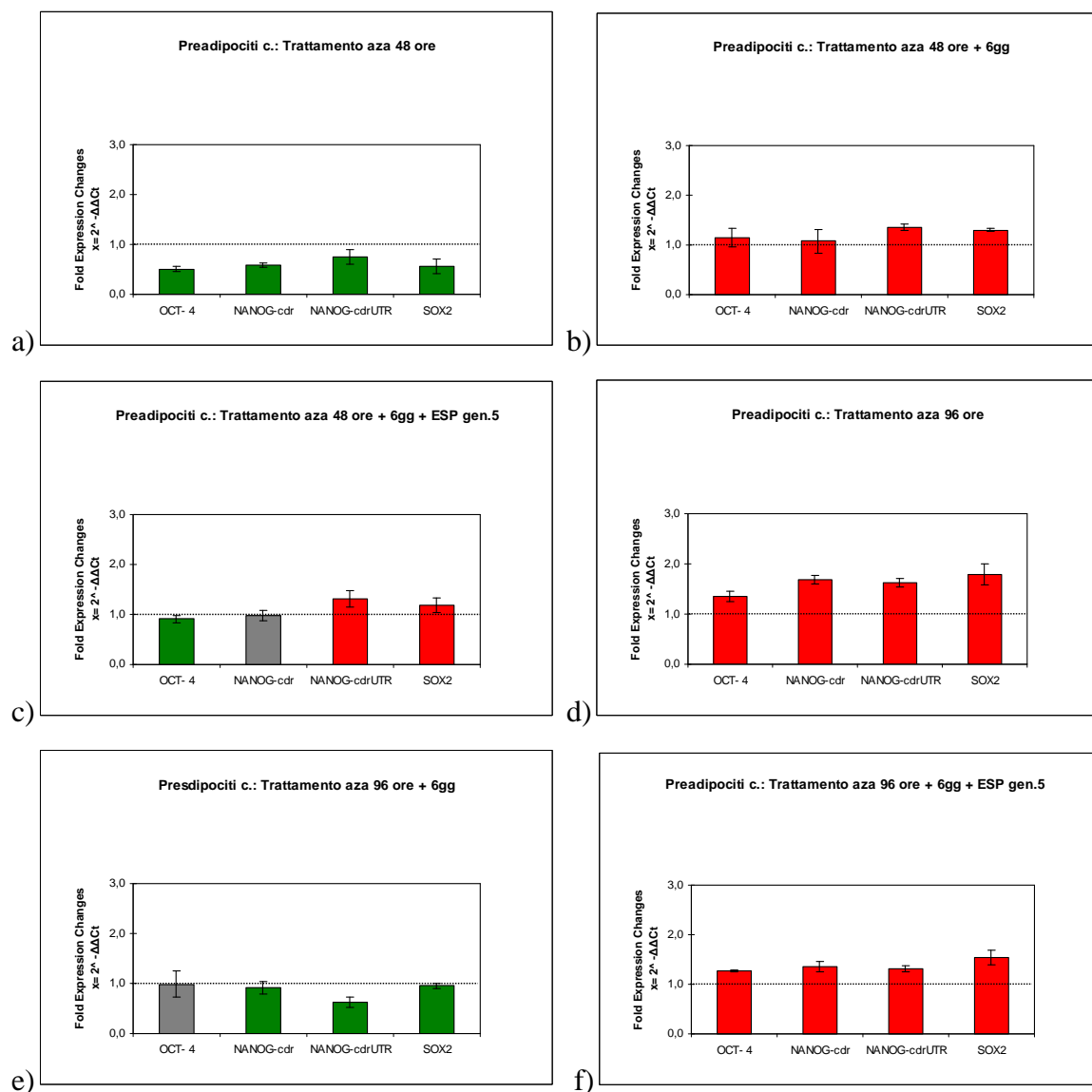


Figura 12.

Real Time PCR in preadipociti commerciali (c.) trattati per 48-96 ore e sub-coltivati. I preadipociti, dopo 48 ore di coltura sono stati incubati con terreno contenente azacitidina 10 μ M per 48-96 ore (a,d), successivamente coltivati per 6 giorni (b,e) ed espansi ulteriormente per 2 generazioni (ESP), cioè fino alla generazione 5 (gen.5,c,f) e sottoposti a Real Time PCR. I geni UP sono rappresentati in rosso, i geni DOWN in verde e quelli invariati rispetto al controllo in grigio.

Tale osservazione preliminare insieme all'analisi complessiva dei dati prodotti, permette di concludere che **il trattamento di 96h con azacitidina 10 μ M rappresenta la condizione migliore per modificare sensibilmente il profilo di espressione genica dei preadipociti commerciali. Utilizzando, infatti, tali parametri di trattamento è possibile:**

- a) *Produrre cellule che manifestano i caratteri genici della “pluripotenza”;*
- b) *Espandere cellule che mantengono nel tempo ovvero nelle successive generazioni il pattern di espressione “staminale”.*

Preadipociti P0208:

La popolazione di preadipociti P0208 era caratterizzata, invece, da una precoce risposta al trattamento in quanto già dopo 48h si osservava un aumento di espressione dei geni OCT-4, NANOG, SOX2 (Figura 13-a).

La successiva coltura in terreno proliferativo (Figura 13-b) non alterava il profilo di espressione osservato alla fine del trattamento.

Nel caso specifico dei preadipociti P0208 la coltura post-trattamento non influenza negativamente l'espressione dei marcatori di staminalità, ovvero seleziona la popolazione con il profilo genico specifico della “puripotenza”.

Esaminando i dati riguardanti l'espressione genica delle cellule P0208 espanse fino alla generazione 5 dopo trattamento T2 (Figura 13-c), si nota che la sub-coltura non favoriva l'espansione delle cellule con caratteristiche di pluripotenza poiché tutti i geni analizzati erano DOWN regolati.

Di seguito (Figura 13-d) sono infine mostrati i risultati ottenuti in campioni di preadipociti P0208 trattati con azacitidina 10 μ M per 96h (T4). In questo caso l'estensione del trattamento a 96h non innalzava il livello di espressione dei geni marcatori di staminalità ovvero ***è possibile UP-regolare l'espressione dei geni OCT-4, NANOG e SOX2 nei preadipociti umani con un'incubazione anche di sole 48h.***

Com'è stato già osservato per i preadipociti commerciali (Figura 12-e), il mantenimento delle cellule in coltura per 6 giorni dopo il trattamento di 96h (Figura 13-e) influenzava negativamente l'espressione dei geni responsabili della pluripotenza; pertanto anche per i

preadipociti P0208 si può ipotizzare che **10 giorni di coltura totale (4 + 6) non sono utili alla produzione di cellule potenzialmente pluripotenti.**

In Figura 13-f è riportato il profilo genico delle cellule P0208 trattate per 96h ed espanse fino alla generazione 5. In conformità a quanto già osservato per il tempo T2 (Figura 13-c), anche la sub-coltura dei preadipociti trattati per 96h non favoriva l'espressione dei geni utili alla comparsa delle caratteristiche di pluripotenza.

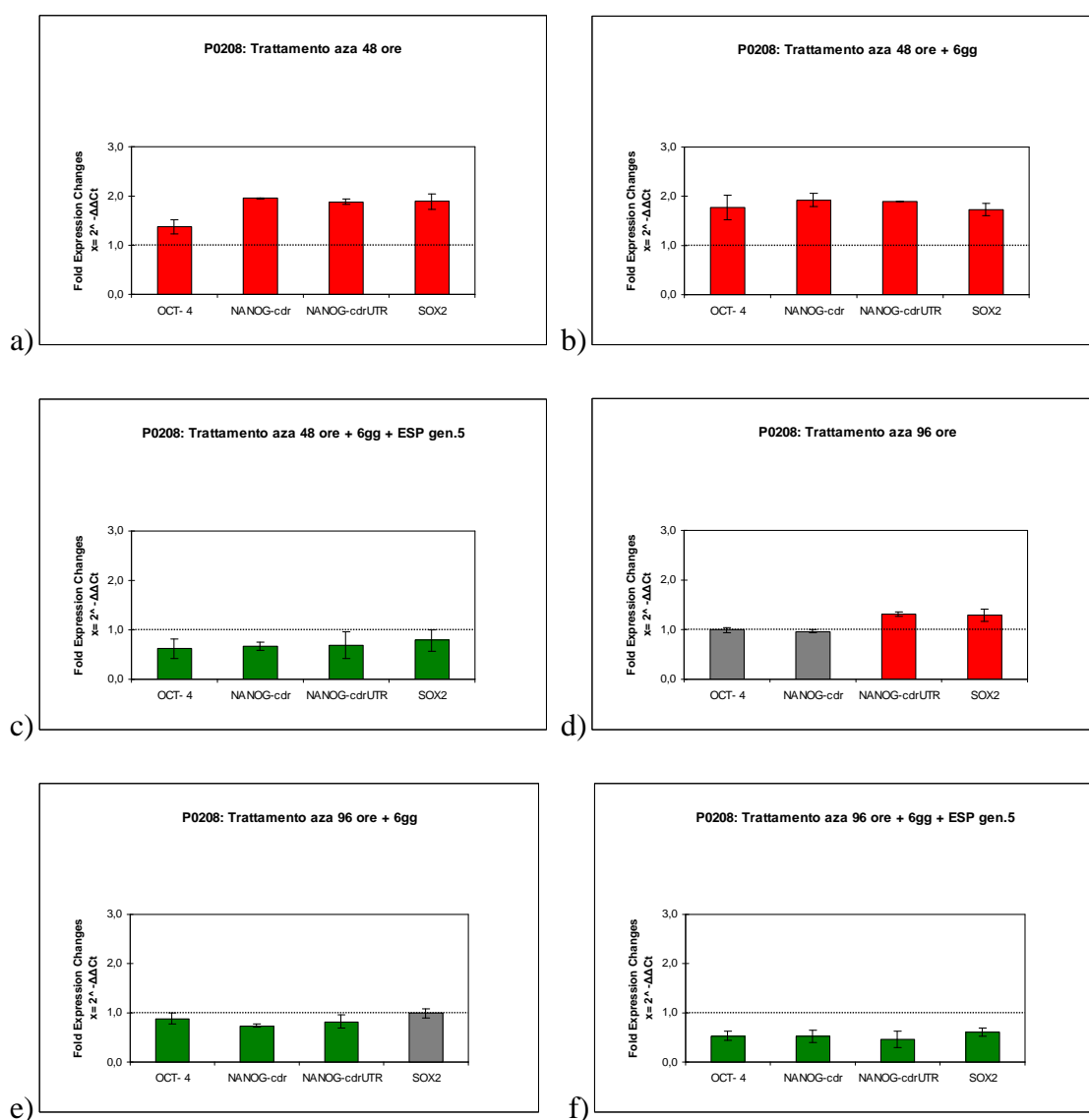


Figura 13.

Real Time PCR in preadipociti P0208 trattati per 48-96 ore e sub-coltivati. I preadipociti, dopo 48 ore di coltura sono stati incubati con terreno contenente azacitidina 10 μ M per 48-96 ore (a,d), successivamente coltivati per 6 giorni (b,e) ed espansi ulteriormente per 2 generazioni (ESP), cioè fino alla generazione 5 (gen.5,c,f) e sottoposti a Real Time PCR. I geni UP sono rappresentati in rosso, i geni DOWN in verde e quelli invariati rispetto al controllo in grigio.

4. LA 5-AZACITIDINA MODULA L'ESPRESSIONE GENICA GLOBALE DEI PREADIPOCITI

Ai tempi considerati per l'analisi di espressione di OCT-4, NANOG e SOX-2, sono stati effettuati esperimenti di Real Time PCR, allo scopo di definire il genotipo dei preadipociti (commerciali e P0208) dopo coltura di 48-96 ore e trattamento con l'agente demetilante seguito o non da successiva coltura ed espansione cellulare.

Come mostrato in seguito, l'agente demetilante rimodulava il genotipo dei preadipociti commerciali (Figura 14 a-f) e delle cellule P0208 estratte presso il nostro laboratorio (Figura 15 a-f) in modo coerente con i dati già discussi e relativi ai geni OCT-4, NANOG e SOX-2.

In particolare è possibile osservare che all'aumento dei geni responsabili della pluripotenza cellulare dopo 96 ore di trattamento dei preadipociti commerciali (Figura 12-d) corrispondeva la diminuzione dell'espressione di geni caratterizzanti le cellule adipose come (ADRP) e "committed" (CD44) come mostrato in Figura 14-d, situazione che permaneva anche dopo successiva espansione delle cellule fino alla generazione 5 (Figura 14-f).

Allo stesso modo, era possibile indurre una variazione del genotipo cellulare, ovvero una sovraespressione dei geni OCT-4, NANOG e SOX-2 (Figura 13-a) e una riduzione dei marcatori CD 29, CD 105 (Figura 15-a) e Fattore di von Willebrand anche con un'incubazione di 48 ore di preadipociti P0208.

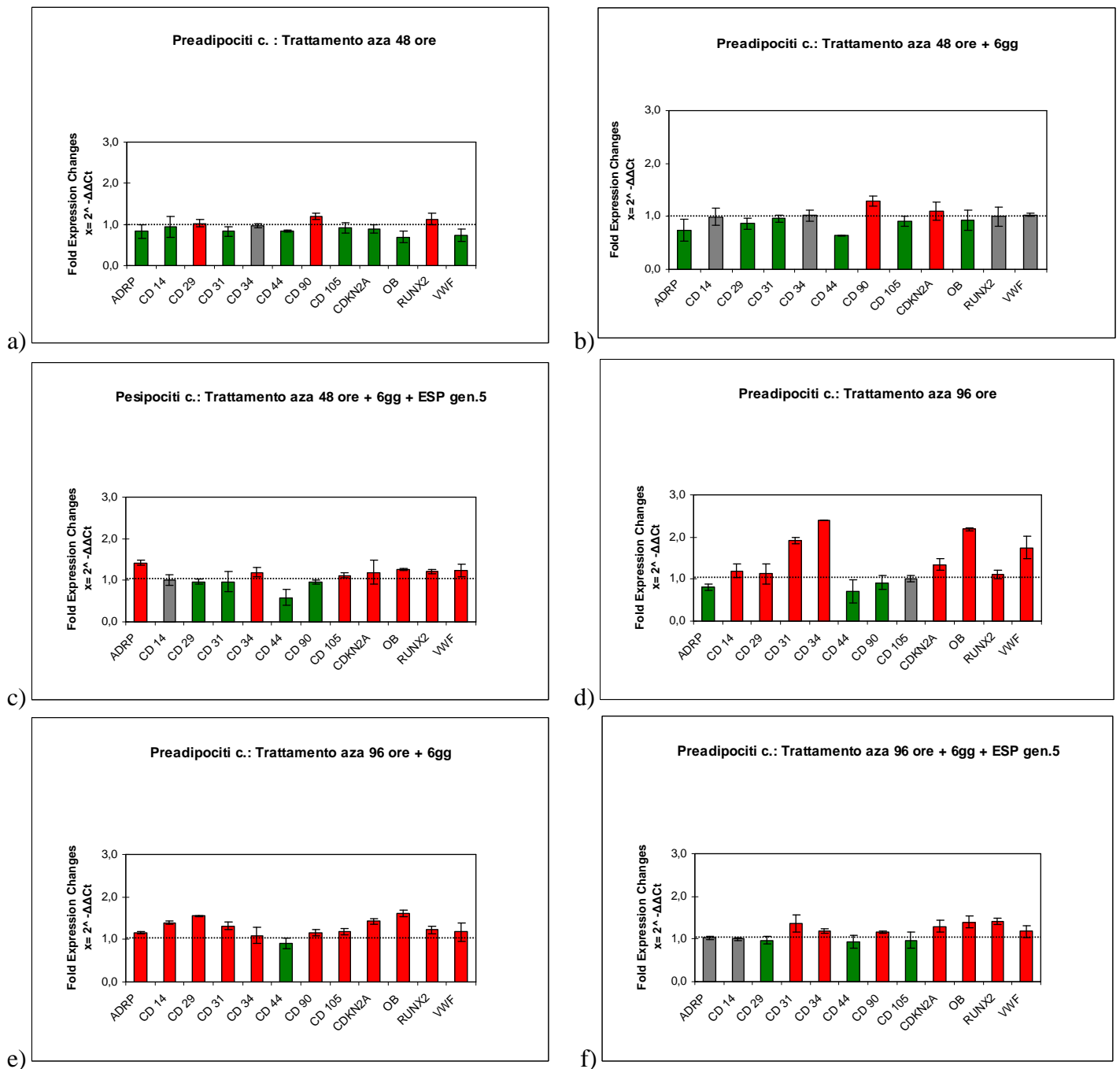


Figura 14.

Real Time PCR in preadipociti commerciali trattati con azacitidina 10 μ M. I preadipociti, dopo 48 ore di coltura sono stati incubati con terreno contenente azacitidina 10 μ M per 48-96h (a,d) e successivamente coltivati per 6 giorni (b,e), espansi ulteriormente per 2 generazioni (ESP-c,f), cioè fino alla generazione 5 (gen.5) e sottoposti a Real Time PCR. I geni UP sono rappresentati in rosso, i geni DOWN in verde e quelli invariati rispetto al controllo (pari a 1) in grigio.

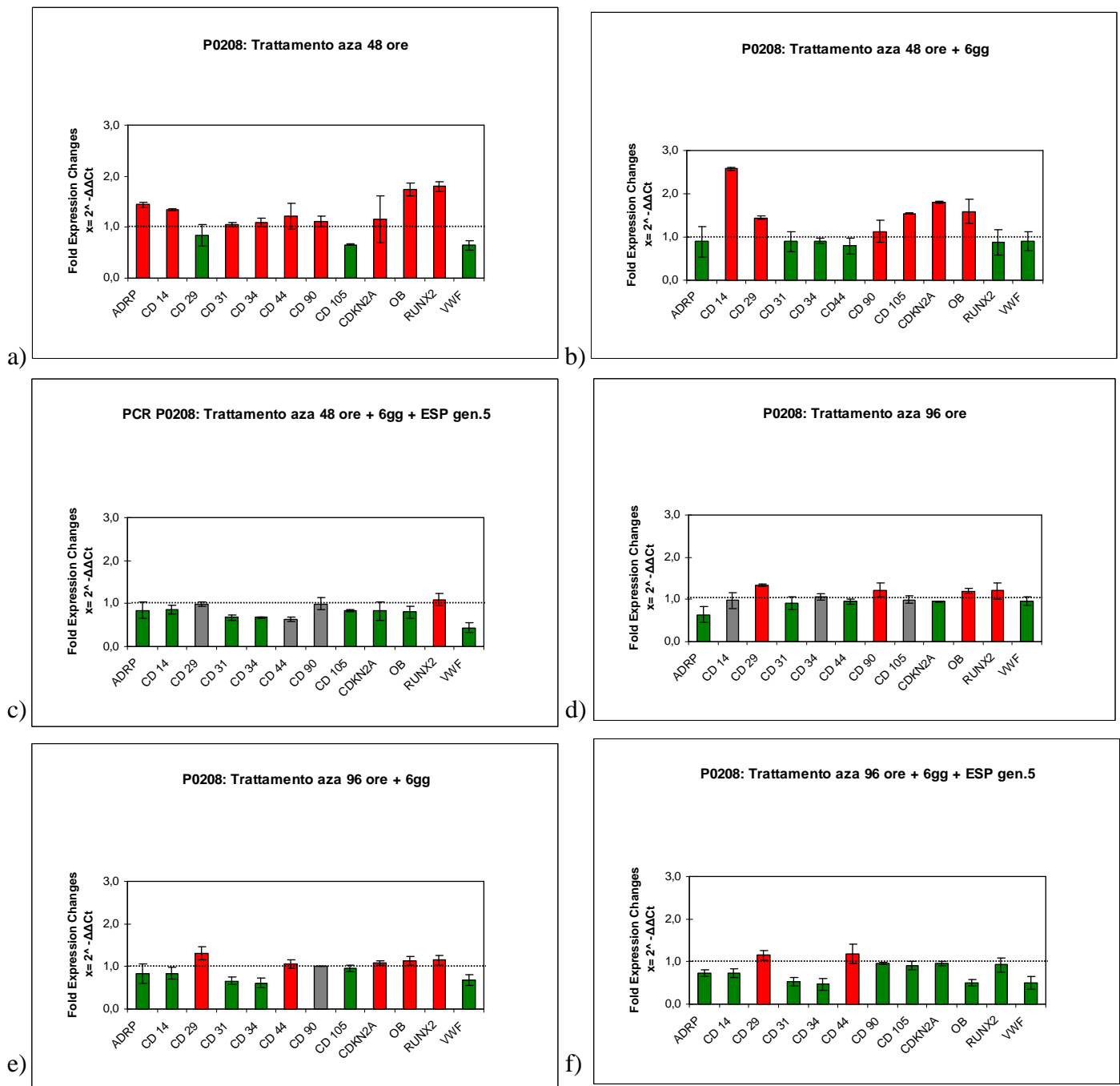


Figura 15.

Real Time PCR in preadipociti P0208 trattati con azacitidina 10 μ M. I preadipociti, dopo 48 ore di coltura sono stati incubati con terreno contenente azacitidina 10 μ M per 48-96h (a,d) e successivamente coltivati per 6 giorni (b,e), espansi ulteriormente per 2 generazioni (ESP-c,f), cioè fino alla generazione 5 (gen.5) e sottoposti a Real Time PCR. I geni UP sono rappresentati in rosso, i geni DOWN in verde e quelli invariati rispetto al controllo (pari a 1) in grigio.

5. LA 5-AZACITIDINA INDUCE LA SOVRA-ESPRESSIONE DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE NANOG

Allo scopo di verificare in che modo la variazione del genotipo cellulare influenzasse il fenotipo cellulare, è stata valutata l'espressione del Fattore di Trascrizione espresso nelle cellule staminali NANOG mediante Western Blot e dei Marcatori di membrana CD14, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD71, CD90, CD105, CXCR4, c-KIT, HLA DR mediante analisi citofluorimetrica.

Per confermare i dati ottenuti in Real Time PCR, ovvero per verificare in che modo la variazione del genotipo cellulare modulasse l'espressione del Fattore di Trascrizione NANOG sono stati eseguiti saggi di Western Blot.

I preadipociti commerciali di generazione 3 sono stati trattati con l'agente demetilante per un periodo di 96h; al termine dell'incubazione è stata effettuata l'estrazione e la quantificazione delle proteine.

Contestualmente la stessa popolazione è stata espansa fino alla generazione 5 e sottoposta alla medesima procedura di estrazione e quantificazione proteica.

L'estratto proteico ottenuto dal campione trattato e di controllo è stato analizzato mediante Western Blot (sono state utilizzate pari quantità di estratto trattato/controllo). I dati preliminari (Figura 16) confermerebbero *la sovraespressione del fattore di trascrizione NANOG dopo trattamento di preadipociti con azacitidina 10 µM*, secondo quanto già dimostrato a livello genico in Real Time PCR (Figura 12-d). Dall'analisi degli estratti proteici ottenuti dai preadipociti di generazione 5, è possibile confermare che la *up regolazione della proteina NANOG è conservata nelle stesse cellule espansive fino a 2 generazioni successive*, secondo quanto già osservato in Real Time PCR (Figura 12-f). Al contrario le cellule di controllo NIH3T3 (fibroblasti embrionali murini) non rispondevano al trattamento con azacitidina.

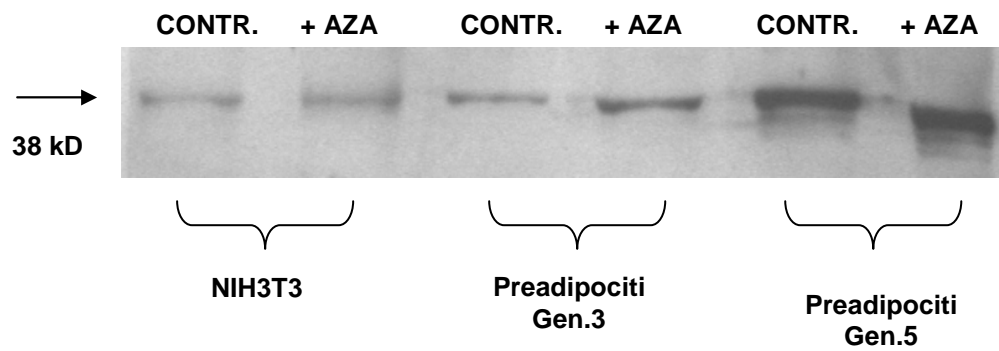


Figura 16.

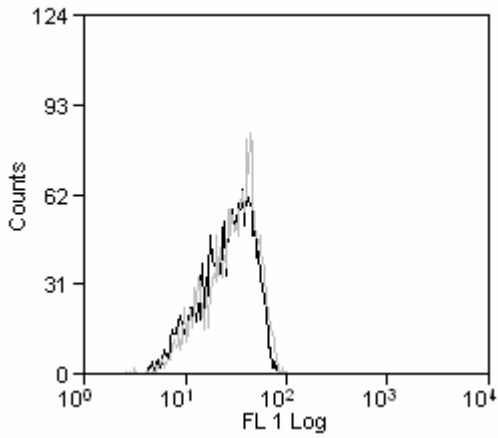
Analisi del Fattore di Trascrizione NANOG mediante Western Blot eseguito su cellule NIH3T3 (Controllo) e su Preadipociti commerciali trattati con azacitidina 10 μ M (Generazione 3, Gen.3) ed espansi dopo trattamento fino alla Generazione 5 (Gen.5).

6. LE CELLULE ESPANSE DOPO TRATTAMENTO SI SELEZIONANO PER MARCATORI SPECIFICI

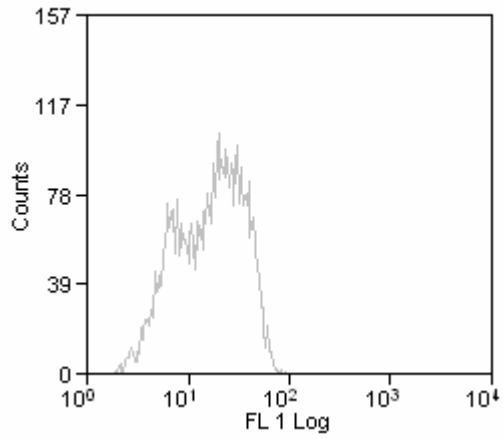
Allo scopo di studiare il fenotipo cellulare dopo trattamento, i preadipociti sono stati coltivati in presenza di 5-azacitidina per 4 giorni; al termine del periodo di incubazione le cellule sono state marcate con anticorpi coniugati a fluorocromi e successivamente analizzate mediante il citofluorimetro Moflo High Speed Cell Sorter (Dako-Beckmann Coulter). In particolare è stata valutata l'espressione dei seguenti Marcatori di membrana: CD14, CD29 (Integrina β), CD34, CD44, CD45, CD71, CD90, CD105, CXCR4, c-KIT, HLA DR. L'analisi è stata effettuata sulla popolazione cellulare vitale, ossia risultata negativa al 7AAD, reattivo utilizzato per la marcatura delle cellule morte.

I risultati ottenuti sono stati successivamente elaborati con l'ausilio di un software dedicato; sono stati, quindi, calcolati i valori di “*subtraction*” (la percentuale di espressione dell'antigene nelle cellule trattate rispetto al controllo). Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi citofluorimetrica relativa ai preadipociti commerciali di generazione 3 al termine del trattamento (Figura 17) e dopo successiva espansione fino alla generazione 5 (Figura 18).

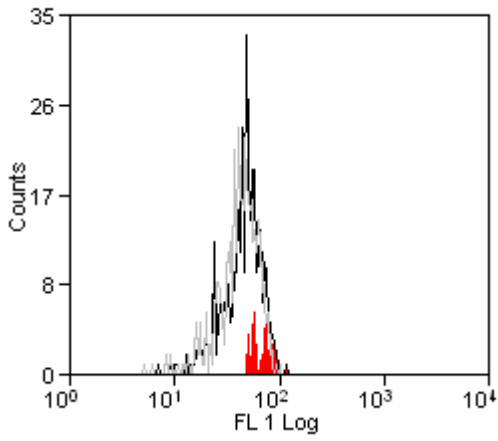
Integrina β – FITC



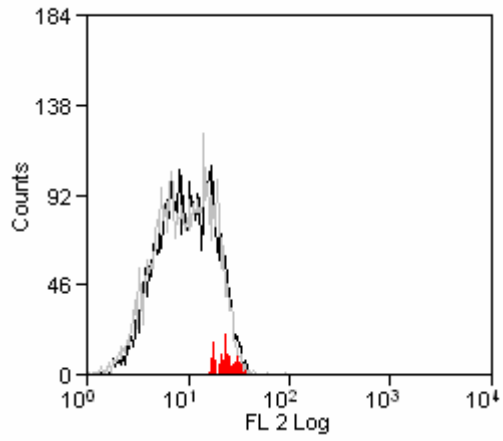
CD34 – FITC 0%



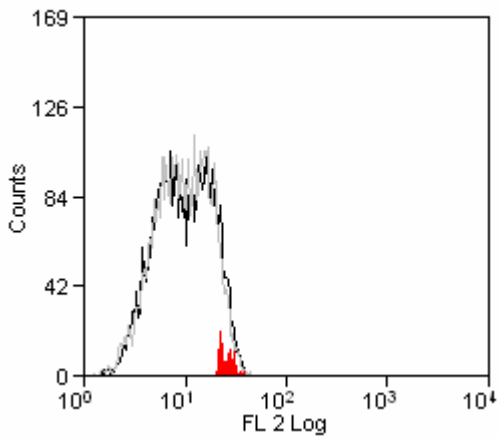
CD90 – FITC 9.2%



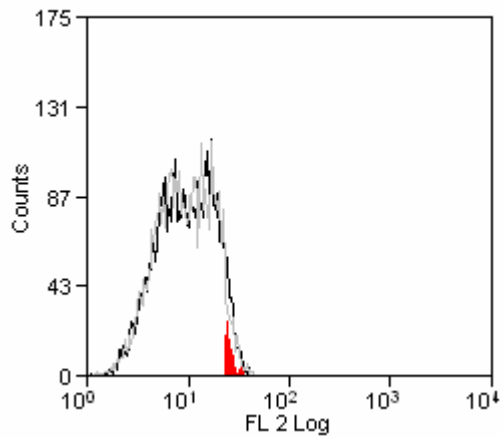
C KIT – PE 2.4%



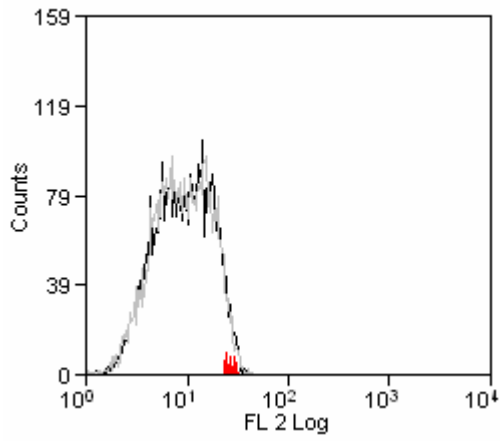
CD14 – PE 2.2%



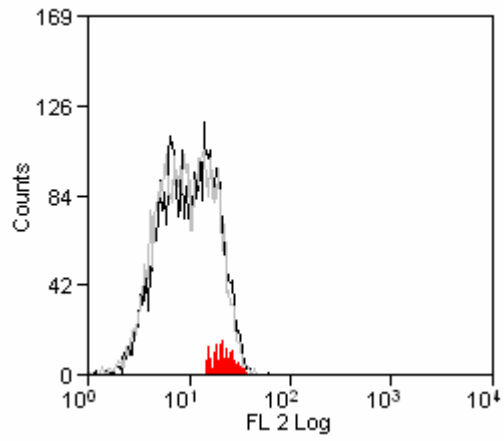
CD44– PE 1.9%



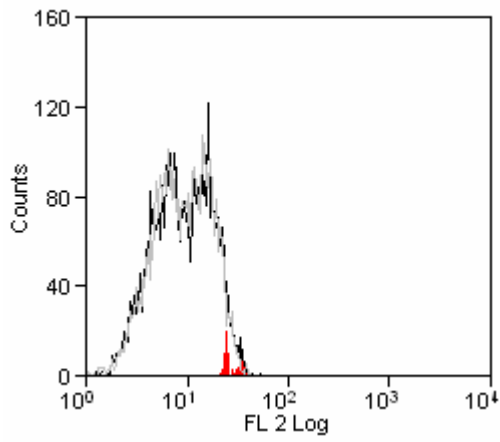
CD45– PE 0.8%



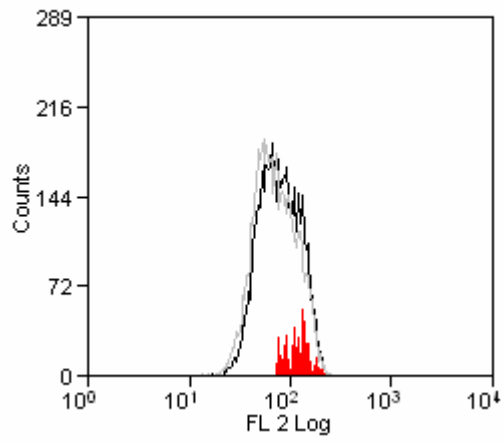
CD71– PE 3.1%



CXCR4– PE 1.4%



CD105- PE 9.1%



HLA-DR- PE 1.1%

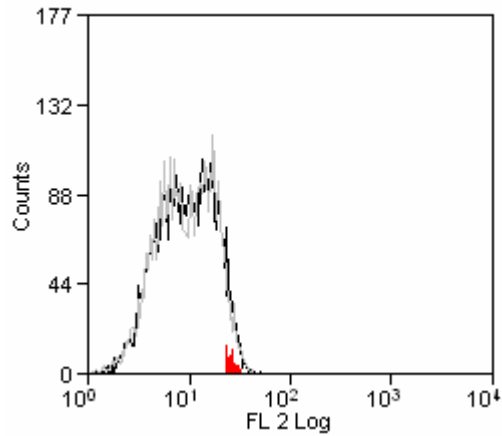
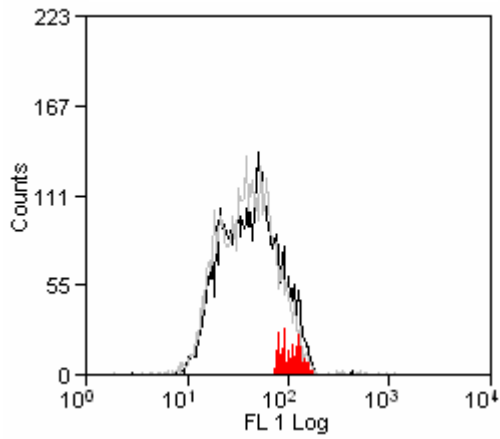


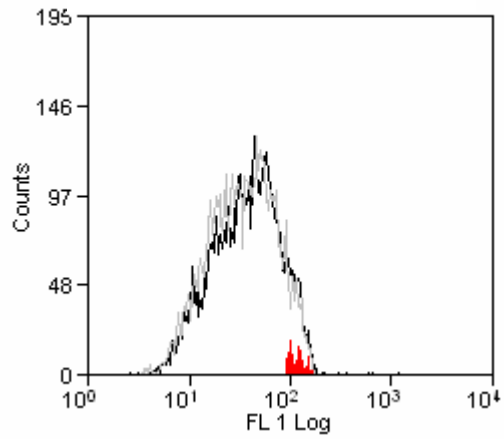
Figura 17.

Analisi citofluorimetrica di preadipociti commerciali (gen.3) dopo 96h di trattamento con azacitidina 10 μ M. Legenda: grigio-controllo (non trattato AZA); nero-trattato (trattato AZA); rosso-positivi. I dati riportati si riferiscono alla subtraction misurata per ciascun anticorpo, nella regione relativa alla popolazione discriminata per marcatura con il 7AAD, sul controllo (non trattato AZA) ed il trattato (trattato AZA) corrispondente.

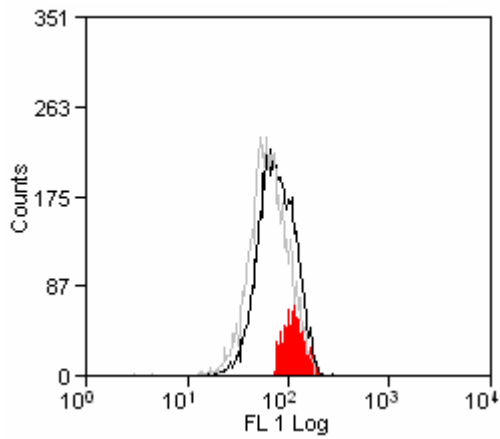
Integrin β – FITC



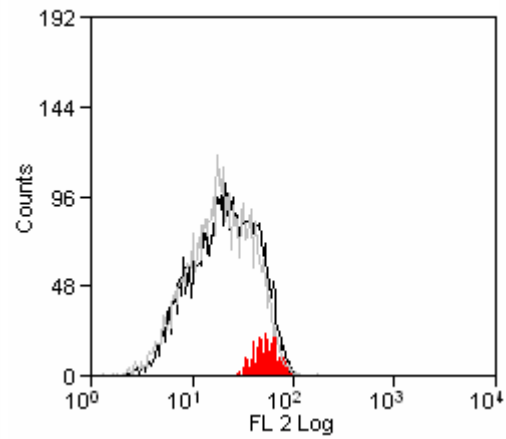
CD34 – FITC 2%



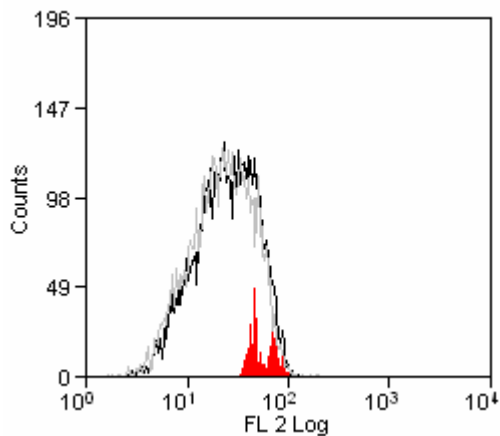
CD90 – FITC



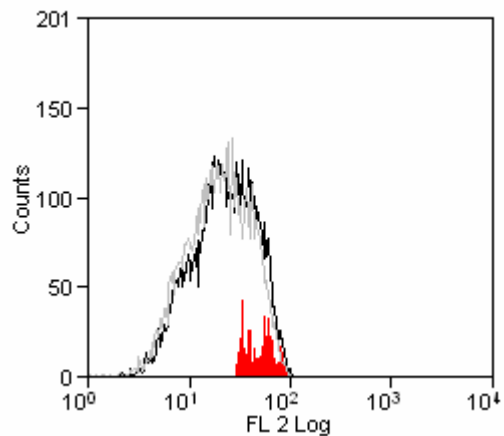
HLA-DR- PE 5.8%



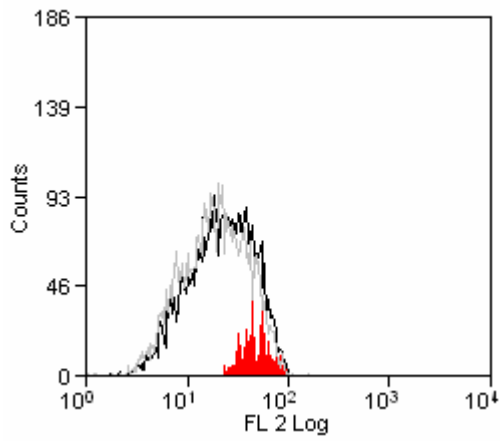
CD14 – PE 5.2%



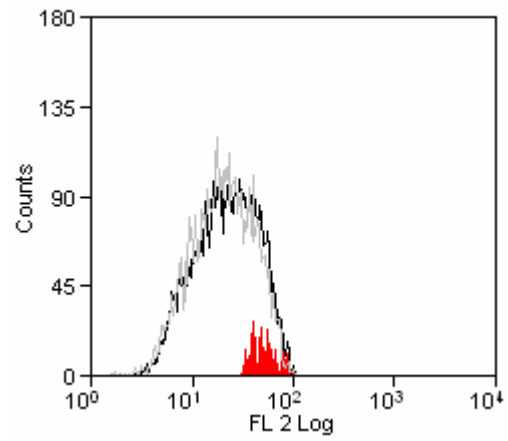
CD44– PE 6.6%



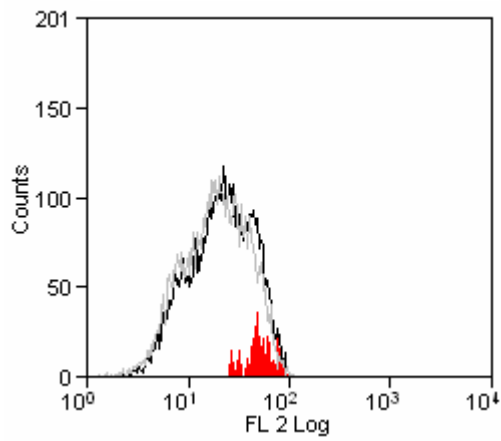
CD45- PE 7.9%



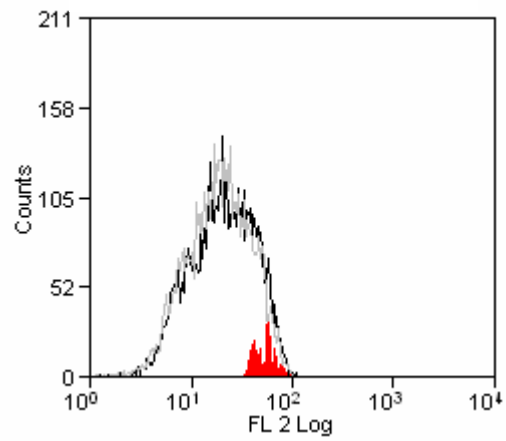
CD71- PE 5.7%



CXCR4- PE 6.3%



C-KIT- PE 4.4%



CD105- PE 9.4%

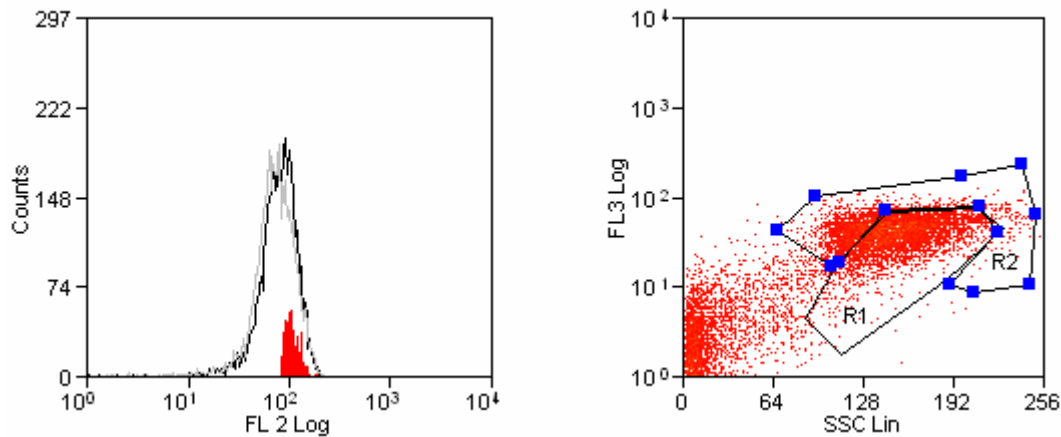
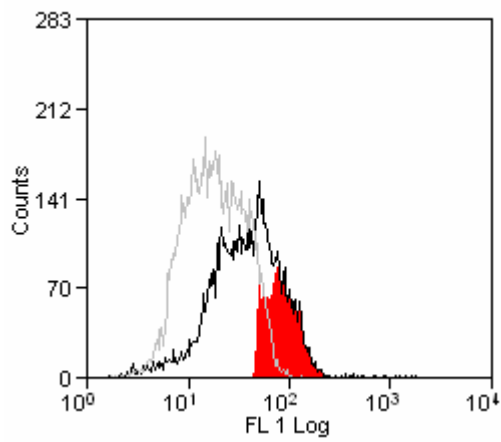


Figura 18.

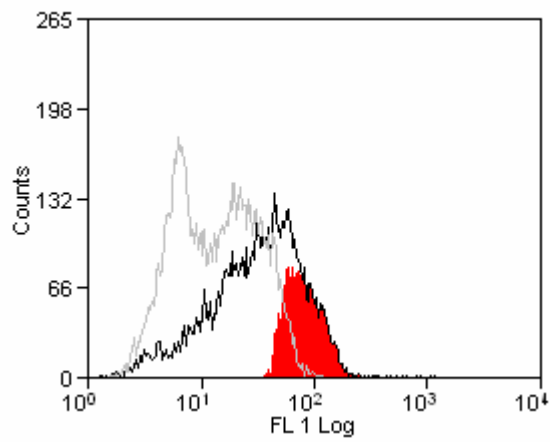
Analisi citofluorimetrica di preadipociti commerciali espansi (gen.5) dopo 96h di trattamento con azacitidina 10 μ M. Legenda: grigio-controllo (non trattato AZA); nero-trattato (trattato AZA); rosso-positivi. I dati riportati si riferiscono alla subtraction misurata per ciascun anticorpo, nella regione relativa alla popolazione discriminata per marcatura con il 7AAD (R1 in dot plot FL3 vs SSC), sul controllo (non trattato AZA) ed il trattato (trattato AZA) corrispondente. La regione R2 in dot plot (FL3 vs SSC) indica la popolazione cellulare non vitale.

Allo scopo di comparare il fenotipo delle cellule espanso dopo trattamento con quello individuato al termine dell'incubazione, sono stati calcolati i valori di "subtraction" tra le popolazioni trattate di generazione 5 e 3 (Figura 19). L'analisi dei risultati ha rivelato che *le cellule espanso dopo trattamento si selezionano per gli antigeni considerati*, che possono incrementare la loro espressione *in misura compresa tra il 2,2 % (CD105) ed il 42,2% (CD90)*.

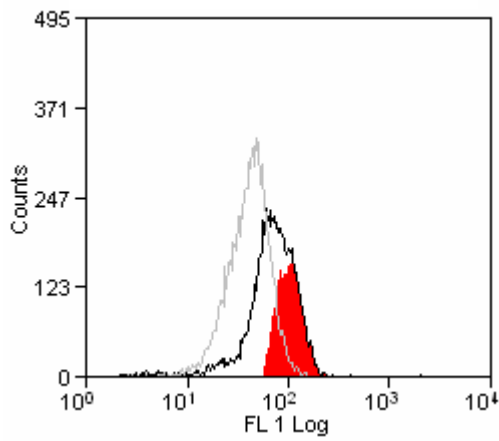
Integrina β – FITC



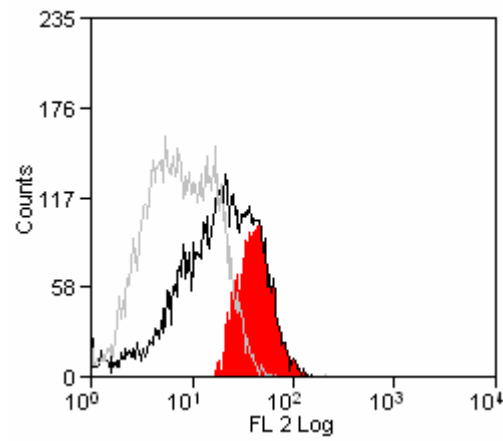
CD34 – FITC



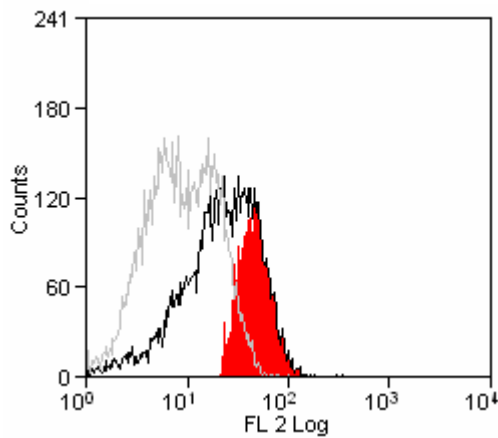
CD90 – FITC



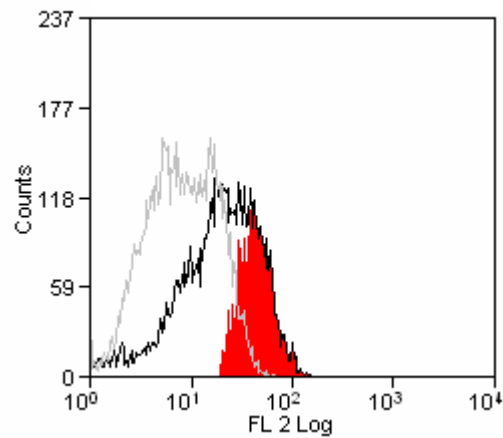
HLA-DR- PE



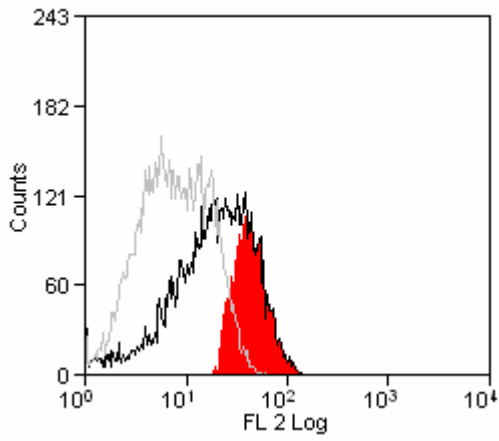
CD14 – PE 35.8%



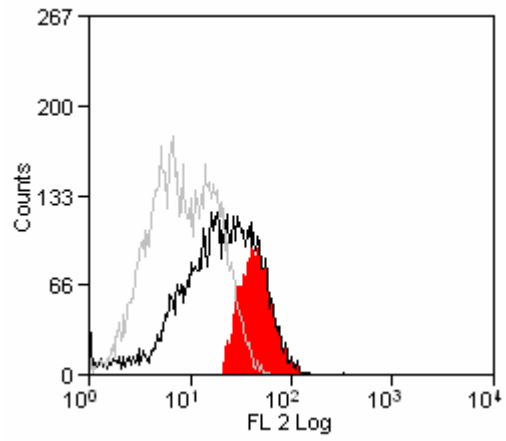
CD44– PE 34.6%



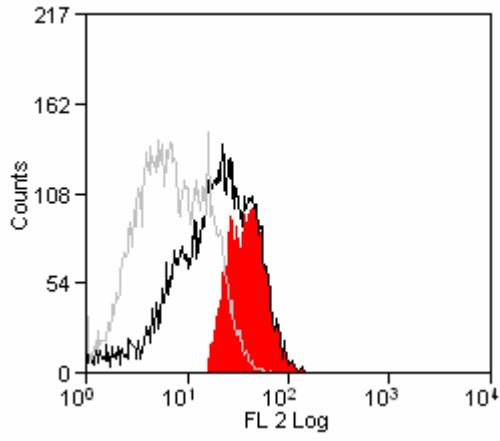
CD45– PE 35.8%



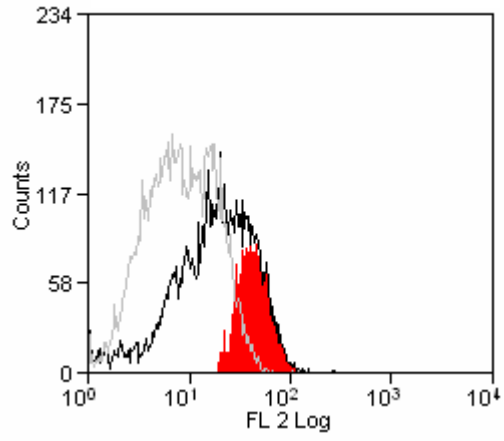
CD71– PE 33.1%



CXCR4– PE



C-KIT- PE 29.1%



CD105- PE 2.2%

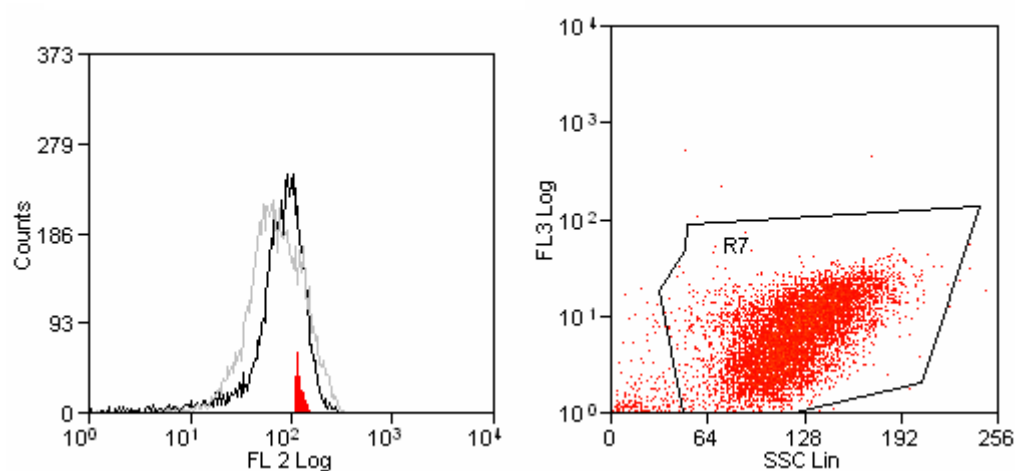


Figura 19.

Analisi citofluorimetrica di preadipociti commerciali trattati con azacitidina (gen.5 vs gen.3). Legenda: grigio-controllo (non trattato AZA); nero-trattato (trattato AZA); rosso-positivi. I dati riportati (normalizzati) si riferiscono alla subtraction Trattato gen.5/Trattato gen.3 misurata per ciascun anticorpo sulle popolazioni nella regione R7 (dot plot FL3 vs SSC), che esclude il detrito.

7. LA 5-AZACITIDINA PERMETTE DI OTTENERE *IN VITRO* CELLULE “RIPROGRAMMATE” E PLURIPOTENTI

Ci si è proposti, infine, di esaminare la capacità multidifferenziativa delle cellule ottenute dopo trattamento con azacitidina, mediante induzione del differenziamento in senso adipogenico, osteogenico, condrogenico e miogenico.

Le cellule ottenute dopo trattamento con azacitidina sono state coltivate in presenza di specifici fattori differenziativi allo scopo di esaminarne la capacità multidifferenziativa. Al termine del periodo di differenziamento sono stati eseguiti saggi citochimici e contemporaneamente sono stati raccolti i campioni per la valutazione dei marcatori di differenziamento in Real Time PCR.

Per l'induzione del differenziamento adipogenico, le cellule sono state mantenute per 48h in terreno DMEM LG, addizionato con FBS 10%, APS 1%, Insulina 10 μ g/ml, Desametasone 1 μ M, Indometacina 60 μ M. Successivamente al terreno è stata addizionata Isobutilmetilxantina 0,5 mM fino al 21° giorno di differenziamento.

Lo studio del fenotipo adiposo è stato effettuato mediante immunofluorescenza e colorazione Oil Red O.

Mediante tecniche di immunofluorescenza sono stati contemporaneamente marcati i lipidi intracitoplasmatici prodotti dalle cellule al termine del differenziamento (Nile Red) ed i nuclei delle cellule adipose (DAPI); l'osservazione dei preparati citologici è stata effettuata mediante microscopia a fluorescenza (Figura 20 a-d) e, ad alto ingrandimento, mediante microscopia confocale (Figura 21 a-d).

Dall'analisi delle immagini (Figura 20-a, Figura 21-a) è possibile constatare che *le cellule trattate con azacitidina 10 μ M conservavano la capacità di differenziarsi in senso adipogenico*, ovvero producevano lipidi intracitoplasmatici dopo stimolo con specifici fattori, in maniera analoga alla popolazione di preadipociti di origine dopo

stimolo con i medesimi fattori (Figura 20-b, Figura 21-b). Al contrario, i preadipociti coltivati in assenza di fattori differenziativi, non si differenziavano e non producevano lipidi indipendentemente dal trattamento con azacitidina (Figura 20 c-d, Figura 21 c-d).

Le *cellule espanse fino alla generazione 5* mostravano le medesime caratteristiche morfologiche e rispondevano *agli stimoli differenziativi adipogenici producendo lipidi citoplasmatici* in maniera analoga alla generazione 3.

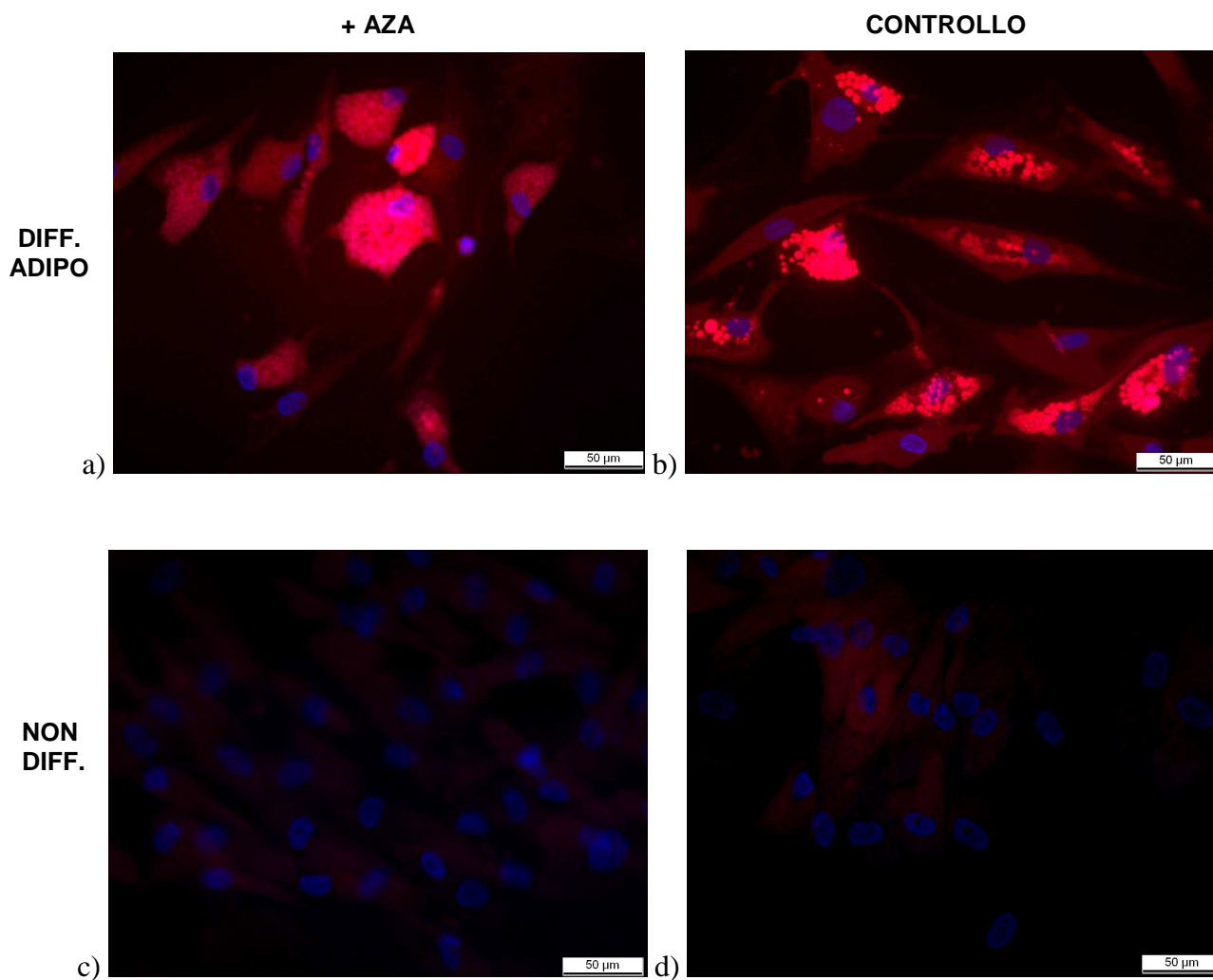


Figura 20. Preadipociti commerciali di generazione 3 trattati (a,c) e non trattati (b,d) con azacitidina 10 µM, differenziati in senso adipogenico per 3 settimane (a-b) e non differenziati (c-d). Le immagini, acquisite al microscopio a fluorescenza con un obiettivo 40X, mostrano campioni citologici in cui sono stati marcati i lipidi intracitoplasmatici con Nile Red (rosso) ed i nuclei con DAPI (blu). Barra 50 µm.

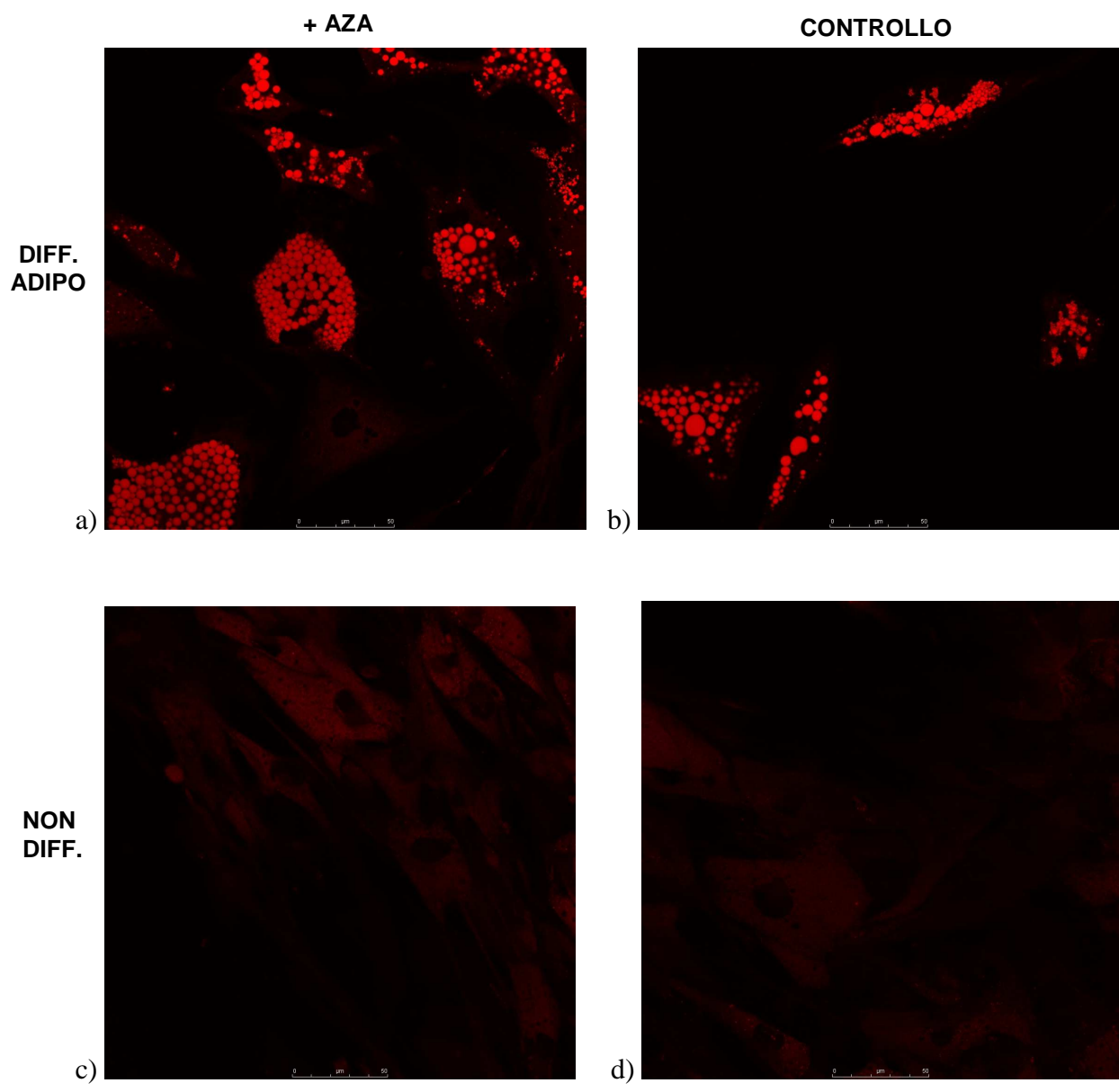


Figura 21.

Preadipociti commerciali di generazione 3 trattati (a,c) e non trattati (b,d) con azacitidina 10 μ M, differenziati in senso adipogenico per 3 settimane (a-b) e non differenziati (c-d). Le immagini, acquisite al microscopio confocale, con un obiettivo 63X mostrano campioni citologici in cui sono stati marcati i lipidi intracitoplasmatici con Nile Red (rosso). Barra 50 μ m.

Lo studio del genotipo adiposo è stato effettuato mediante l'analisi di espressione in Real Time PCR dei seguenti marcatori di differenziamento adipogenico: CEBP/ α , CEBP/ β , CEBP/ δ , Lipoprotein Lipasi (LPL), Leptina (OB) e GLUT-4.

La Figura 22 dimostra che *le cellule trattate con azacitidina 10 μ M conservavano la capacità di differenziarsi in senso adipogenico*, ovvero esprimevano i marcatori genici dopo stimolo con specifici fattori, in maniera analoga alla popolazione di preadipociti non trattati e stimolati con i medesimi fattori.

Tali risultati sono coerenti con quelli ottenuti mediante i saggi citologici che dimostravano l'attitudine delle cellule di rispondere *agli stimoli differenziativi adipogenici e di produrre lipidi citoplasmatici* indipendentemente dal trattamento con azacitidina.

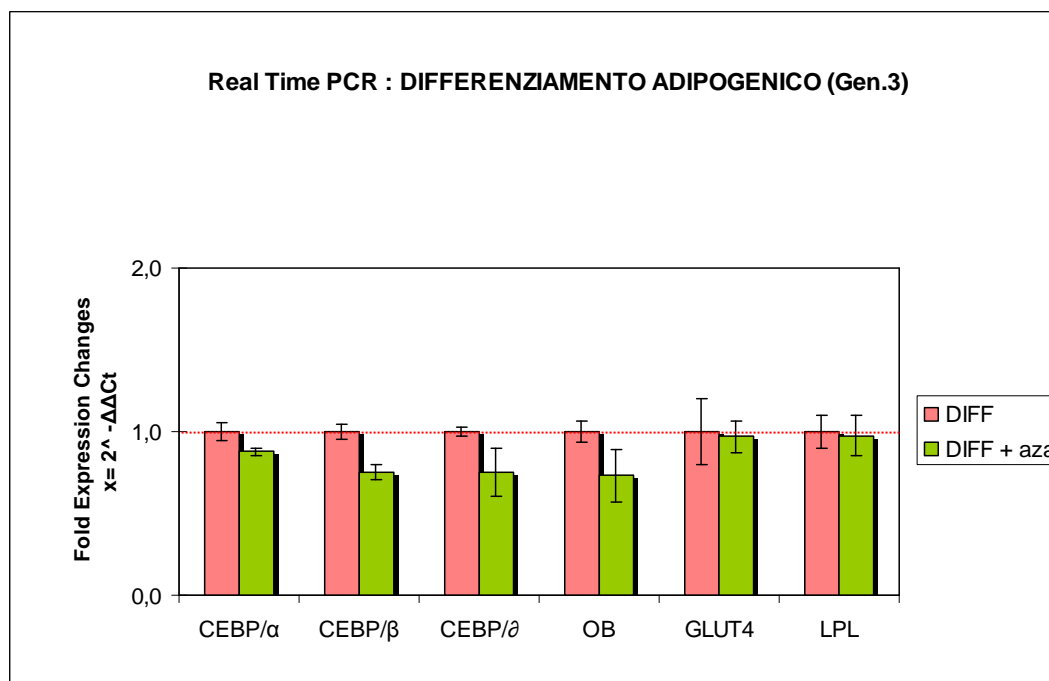


Figura 22.

Preadipociti commerciali di generazione 3 trattati con azacitidina 10 μ M e differenziati in senso adipogenico per 3 settimane (DIFF + aza) e preadipociti di controllo (non trattati con azacitidina e successivamente differenziati, DIFF). L'istogramma mostra che le cellule conservano la capacità di esprimere specifici marcatori adipogenici indipendentemente dal trattamento demetilante.

L'induzione osteogenica è stata effettuata coltivando le cellule trattate con azacitidina in terreno differenziativo costituito da: MEM, FBS 10%, APS 1%, Desametasone 100nm, β -glicerofosfato 10nM, ac.ascorbico-2-fosfato 0,05mM.

Al termine dei 21 giorni le cellule sono state sottoposte ad una serie di indagini allo scopo di caratterizzarne il fenotipo e l'attività. In Figura 23 è mostrata la colorazione delle cellule con Alizarina Red, un colorante selettivo per il carbonato di calcio e usato per verificare la produzione di matrice ossea. Dall'analisi dei campioni cellulari, si osserva che *le cellule trattate con azacitidina rispondevano al differenziamento osteogenico e producevano più depositi di calcio rispetto al controllo.*

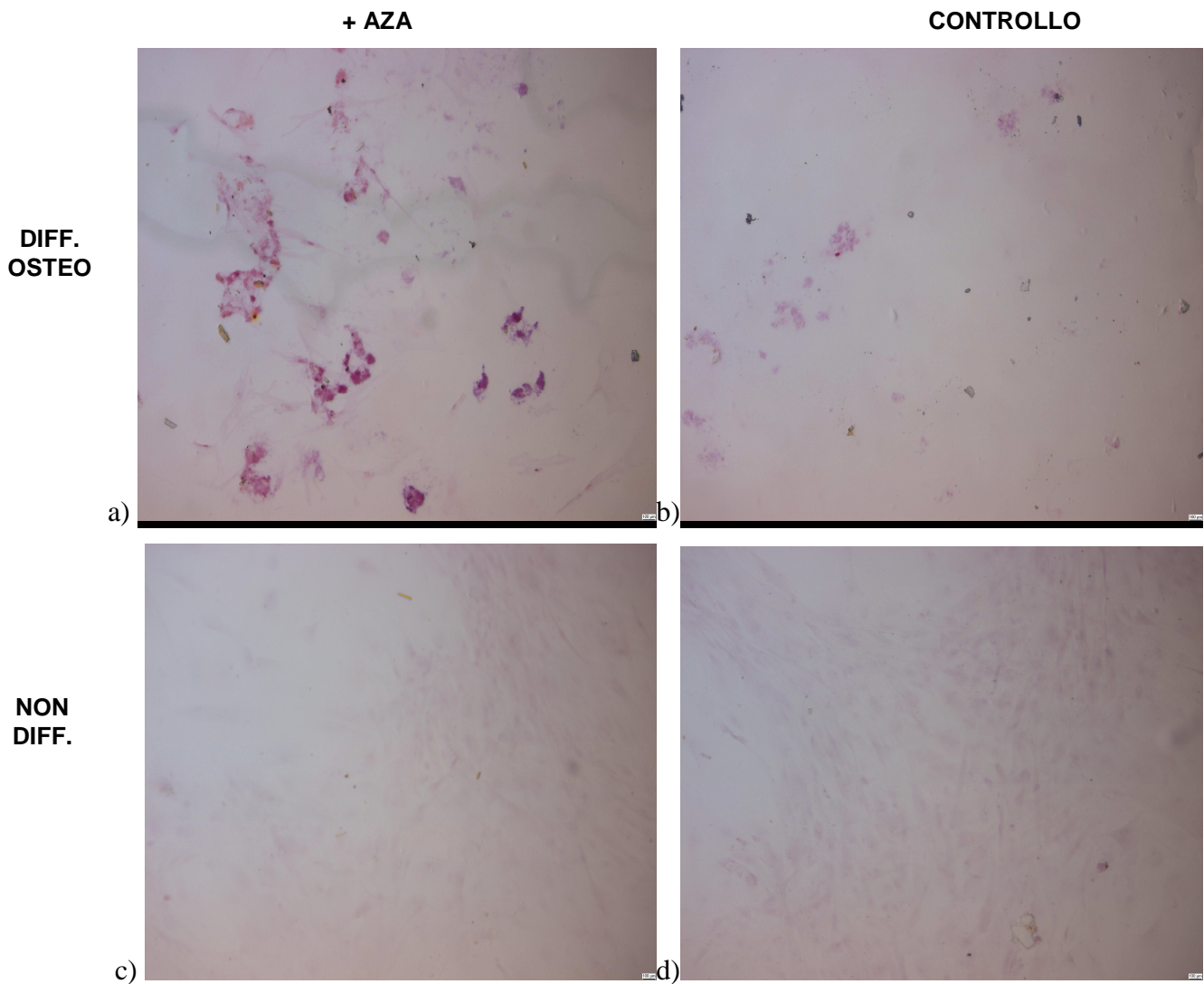


Figura 23.

Preadipociti commerciali di generazione 3 trattati (a,c) e non trattati (b,d) con azacitidina 10 μ M differenziati in senso osteogenico per 3 settimane (a-b) e non differenziati (c-d). Le immagini sono state acquisite al microscopio ottico con obiettivo 10X e mostrano i depositi di calcio colorati con Alizarina Red. Barra 100 μ m.

Nei campioni citologici differenziati in senso osteogenico è stata valutata, inoltre, l'espressione della Fosfatasi Alcalina tessuto-specifica che indica l'acquisizione dell'attività enzimatica tipica della linea osteogenica.

La specifica colorazione mostrata in Figura 24 rivelerebbe la *presenza della Fosfatasi Alcalina nelle cellule trattate con azacitidina e successivamente differenziate in senso osteogenico*; tuttavia la valutazione quantitativa dell'enzima in oggetto, eseguita allo

scopo di misurare l'effettiva variazione di espressione tra campioni trattati e di controllo, ha mostrato che la Fosfatasi alcalina è presente in entrambi i campioni in quantità paragonabile (Figura 26).

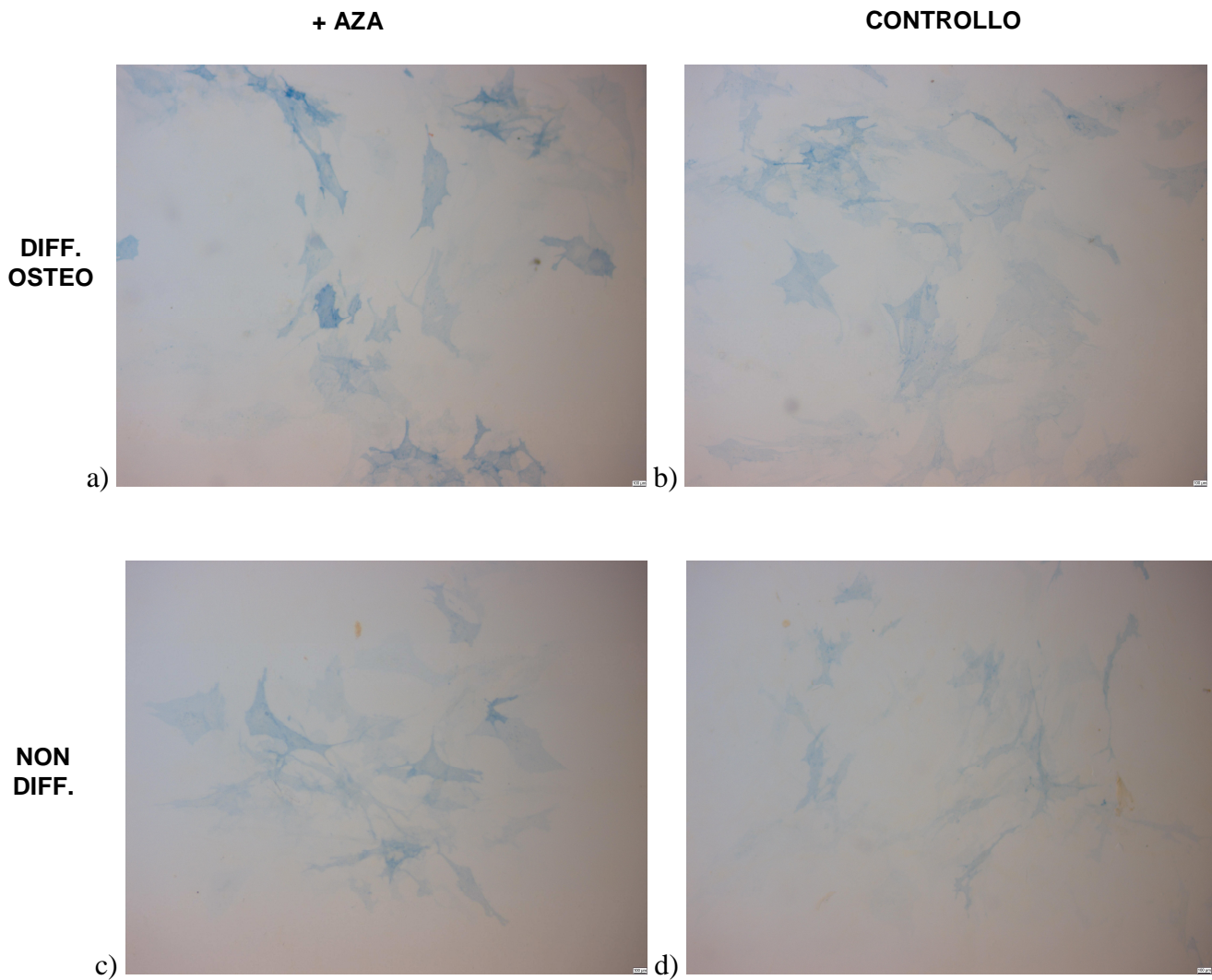


Figura 24.

Preadipociti commerciali di generazione 3 trattati (a,c) e non trattati (b,d) con azacitidina 10 µM, differenziati in senso osteogenico per 3 settimane (a-b) e non differenziati (c-d). Le immagini sono state acquisite al microscopio ottico con obiettivo 10X e mostrano la colorazione della Fosfatasi Alcalina che indica l'acquisizione dell'attività enzimatica tipica della linea osteogenica. Barra 100 µm.

Allo stesso modo, *le cellule espanse fino alla generazione 5 rispondevano agli stimoli induttivi osteogenici, producevano depositi di calcio ed esprimevano la fosfatasi alcalina* (dati non mostrati). Per meglio definire il fenotipo delle cellule differenziate è stata, infine, valutata l'espressione di specifici marcatori ossei quali il Runx2, l'Osteopontina (OPN) e l'Osteocalcina con tecniche di immunofluorescenza. L'analisi di immagine ha rivelato che al 21° giorno di differenziamento osteogenico, le cellule non esprimevano Runx2 (marcatore precoce di differenziamento); al contrario esse mostravano i marcatori tardivi Osteopontina (Figura 25) e Osteocalcina (dati non mostrati). I risultati ottenuti dimostrano che *le cellule trattate con azacitidina si differenziavano in senso osteogenico ed esprimevano i marcatori Osteopontina e Osteocalcina.*

Le indagini di Real Time PCR hanno, in seguito, consentito di quantificare la variazione di espressione dei marcatori di differenziamento osteogenico tra cellule trattate e di controllo.

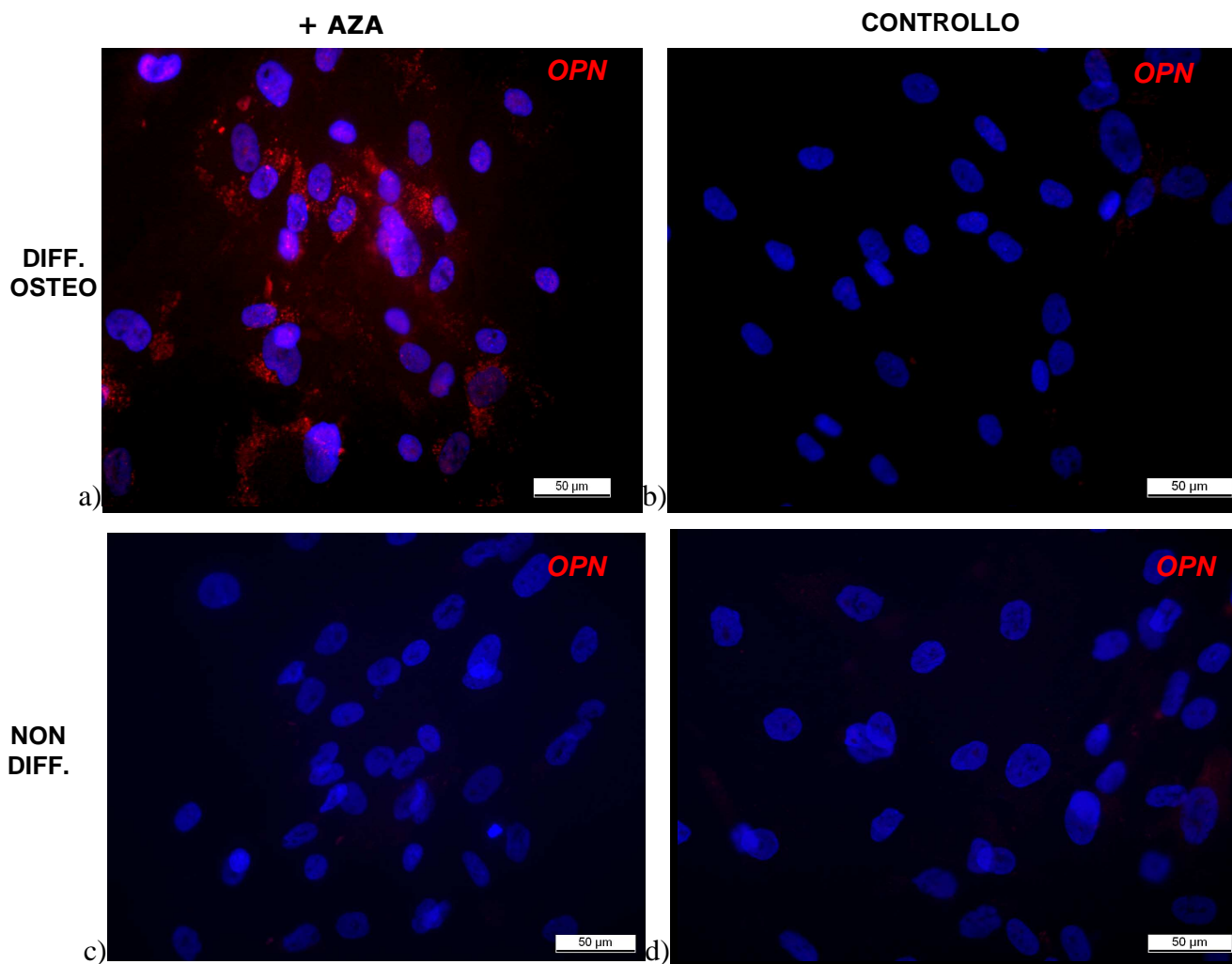


Figura 25.

Analisi al microscopio a fluorescenza con obiettivo 40X di Osteopontina (OPN), in Preadipociti commerciali di generazione 5 trattati (a,c) e non trattati (b,d) con azacitidina 10 µM, differenziati in senso osteogenico per 3 settimane (a-b) e non differenziati (c-d). OPN è marcata con fluorocromo Alexa 594 (rosso), i nuclei con DAPI (blu). Barra 50 µm.

Lo studio di espressione ha confermato i dati acquisiti con i saggi citochimici; al 21° giorno di differenziamento osteogenico si è osservato che *le cellule di generazione 5 trattate con azacitidina e differenziate sovraesprimevano i marcatori Osterix e Osteopontina (OPN)*; al contrario non si osservava una rilevante UP-regolazione del Runx2 (marcatore precoce di differenziamento) e della Fosfatasi alcalina tessuto-specifica (Figura 26-a). E' interessante, infine, notare che l'azacitidina modulava l'espressione genica principalmente in cellule espanse di generazione 5; le cellule trattate

e differenziate in generazione 3 non presentavano, infatti, una significativa variazione genica dei fattori considerati (Figura 26-b).

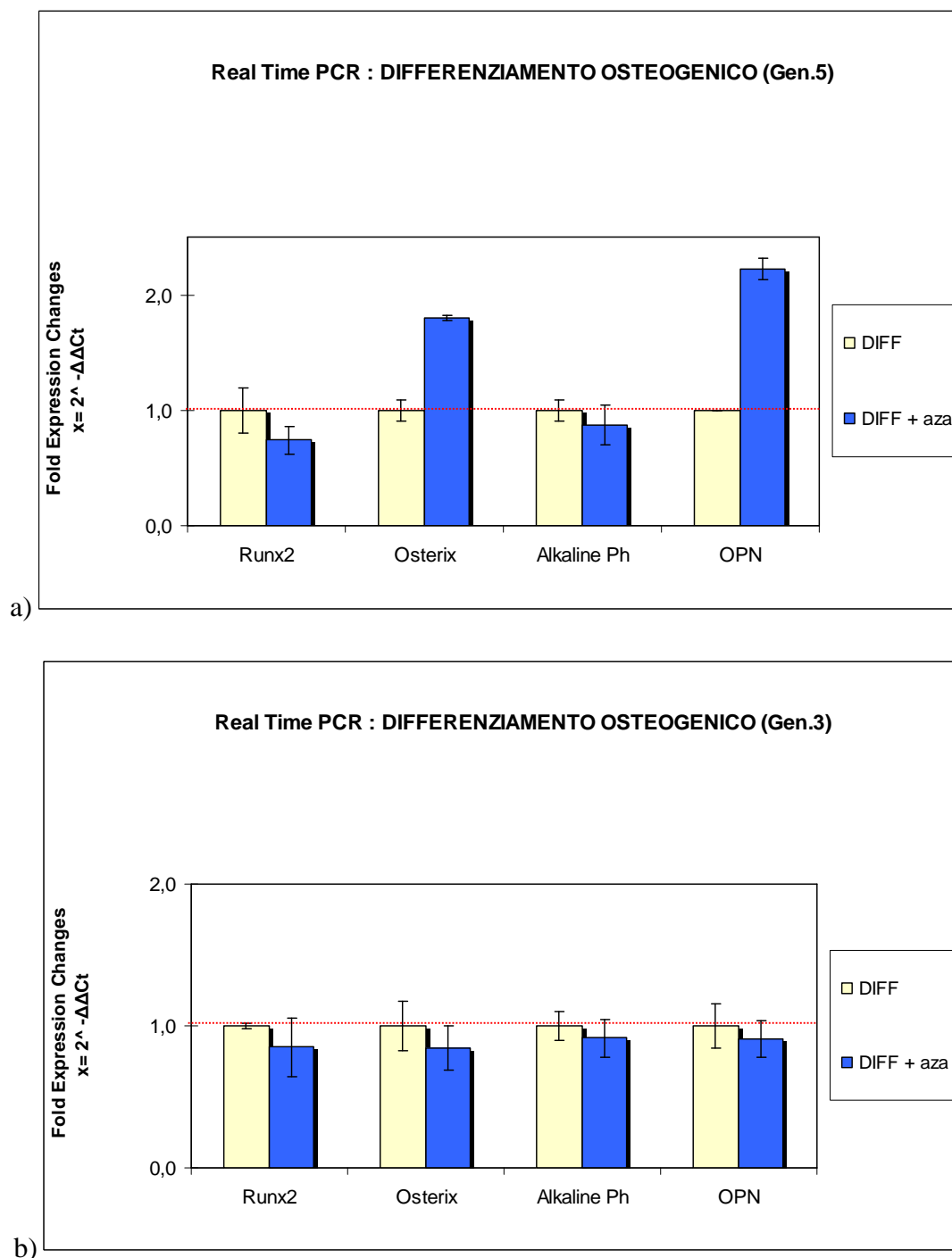


Figura 26.

Preadipociti commerciali di generazione 5 (a) e di generazione 3 (b) trattati con azacitidina 10 μ M e differenziati in senso osteogenico per 3 settimane (DIFF + aza) e preadipociti di controllo (non trattati con azacitidina e successivamente differenziati, DIFF). L'istogramma mostra che le cellule di generazione 5 sottoposte a trattamento demetilante sovra-esprimono i marcatori Osterix e OPN al 21° giorno di differenziamento.

In seguito è stata valutata la capacità della popolazione ottenuta dopo trattamento demetilante di produrre condrociti maturi. Per l'induzione del differenziamento condrogenico le cellule sono state coltivate per 21 giorni in terreno STEMPRO Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (GIBCO) addizionato con STEMPRO Chondrogenesis Supplement (GIBCO).

Le immagini acquisite al microscopio confocale (Figura 27) dimostrano che *le cellule trattate con azacitidina rispondevano allo stimolo differenziativo condrogenico esprimendo il perlecano*, proteoglicano marcatore dei condrociti maturi. Analogamente, *le cellule espanse fino alla generazione 5 rispondevano agli stimoli induttivi condrogenici conservando la produzione di perlecano* (dati non mostrati).

Le indagini di Real Time PCR hanno permesso di completare lo studio di espressione di altri marcatori (Sox9 e Aggrecano) e di quantificarne la variazione tra cellule trattate e di controllo.

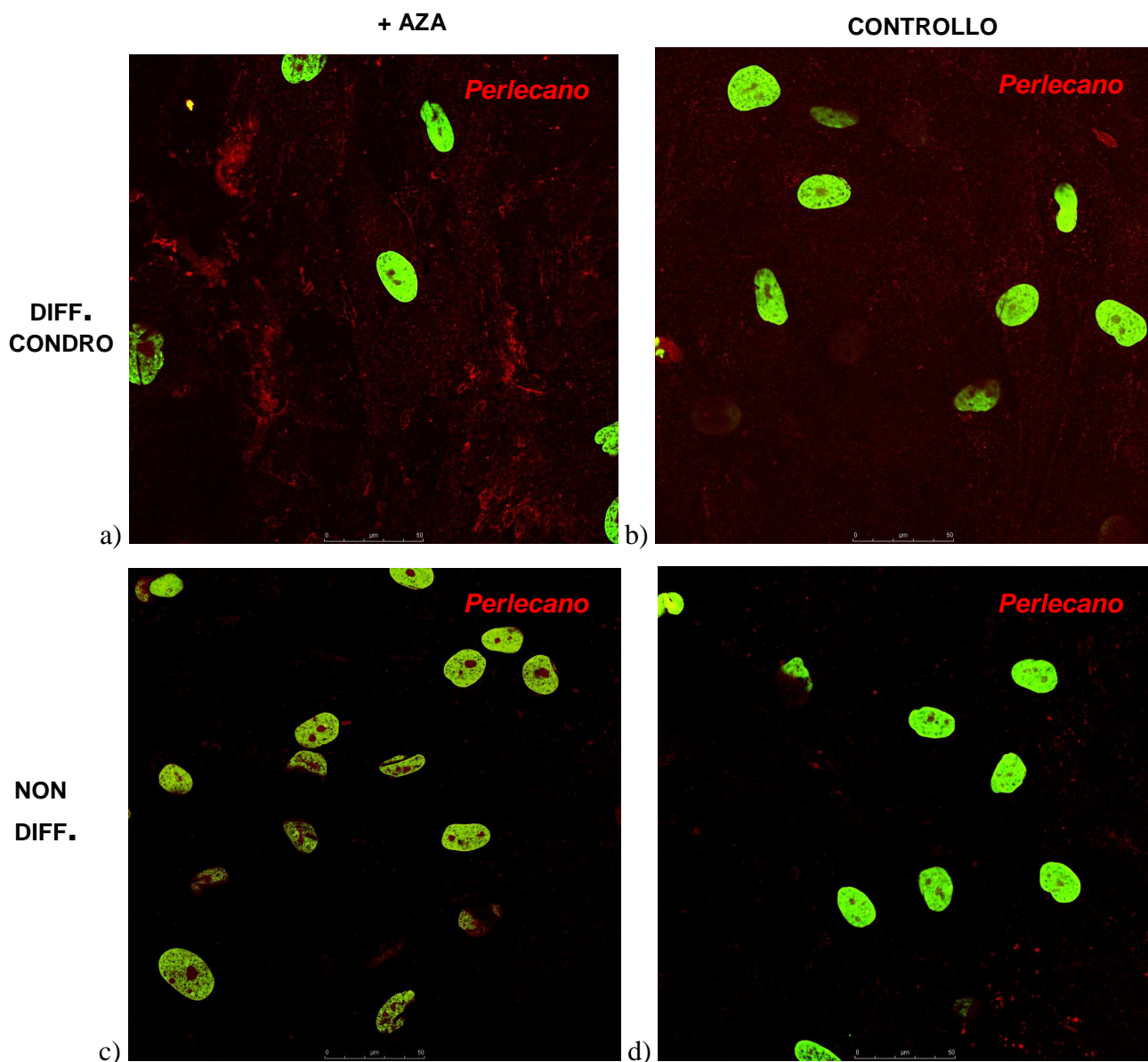


Figura 27.

Analisi al microscopio confocale di Preadipociti commerciali di generazione 3 trattati (a,c) e non trattati (b,d) con azacitidina 10 μ M, differenziati in senso condrogenico per 3 settimane (a-b) e non differenziati (c-d). Perlecano è marcato con fluorocromo Alexa 594 (rosso), i nuclei con Sytox Green (verde). Le immagini sono state acquisite con obiettivo 63X. Barra 50 μ m.

Coerentemente con quanto è stato osservato in ambito cellulare, gli studi di Real Time (Figura 28-a) dimostrano che *le cellule trattate con azacitidina rispondevano allo stimolo differenziativo condrogenico esprimendo il Perlecano e sovra-esprimendo Sox9 e Aggregano* (marcatori dei condrociti).

Analogamente a quanto osservato per l'induzione osteogenica, le cellule espanse di generazione 5 mostravano una variazione genica molto più significativa rispetto alle stesse cellule di generazione 3 (Figura 28-b).

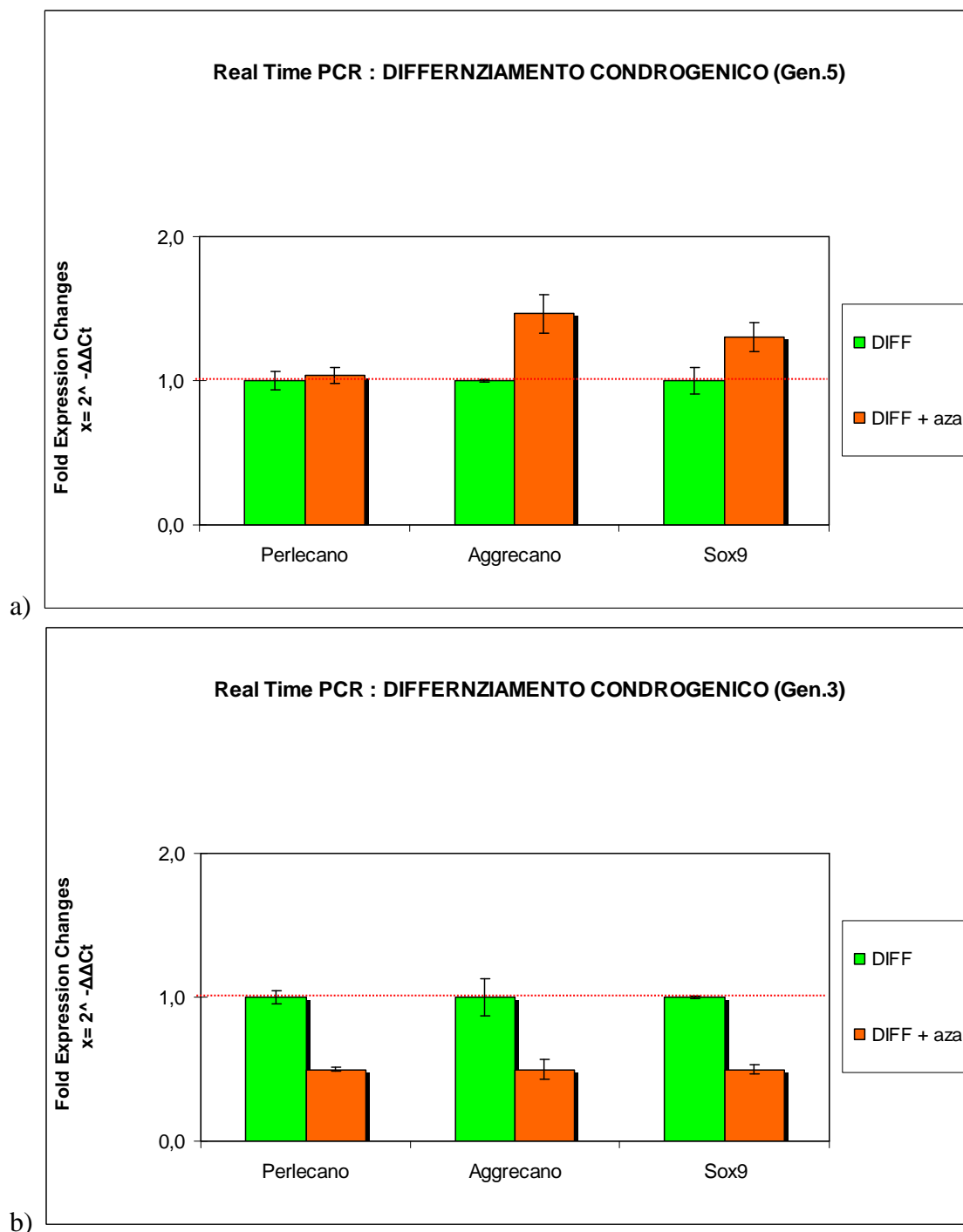


Figura 28.

Preadipociti commerciali di generazione 5 (a) e di generazione 3 (b) trattati con azacitidina 10 μ M e differenziati in senso condrogenico per 3 settimane (DIFF + aza) e preadipociti di controllo (non trattati con azacitidina e successivamente differenziati, DIFF). L'istogramma mostra che le cellule di generazione 5 sottoposte a trattamento demetilante sovra-esprimono i marcatori Aggregano e Sox9 al 21° giorno di differenziamento.

E' stata, infine, valutata la capacità delle cellule trattate e "riprogrammate" di differenziare in senso miogenico.

Il differenziamento miogenico è stato ottenuto in due fasi: nella prima fase, definita "induzione", le cellule sono state coltivate per 48h in terreno costituito da DMEM HG, FBS 20%, APS 1%, 5-Azacidina 10µM; nella successiva fase di "mantenimento" la coltura cellulare è stata differenziata in DMEM HG, FBS 20%, APS 1%, Hourse serum 10%, Chick embryo extract 1% fino al 21° Giorno.

L'analisi della morfologia cellulare, effettuata al termine del periodo di differenziamento, ha rivelato che *la popolazione ottenuta dopo trattamento demetilante e sottoposta a stimoli differenziativi miogenici* assumeva una morfologia peculiare: si osservava la formazione di *strutture plurinucleate e fusiformi* (Figura 29-a, freccia) che esprimevano *specifici marcatori miogenici, quali Myf5, MyoD e Miogenina* (Figura 30).

Tali strutture erano presenti anche in campioni non trattati con azacidina e successivamente differenziati in senso miogenico; tale fenomeno potrebbe essere legittimato dall'impiego dell'azacidina nella fase di induzione prevista dal protocollo di differenziamento in oggetto (sopra descritto).

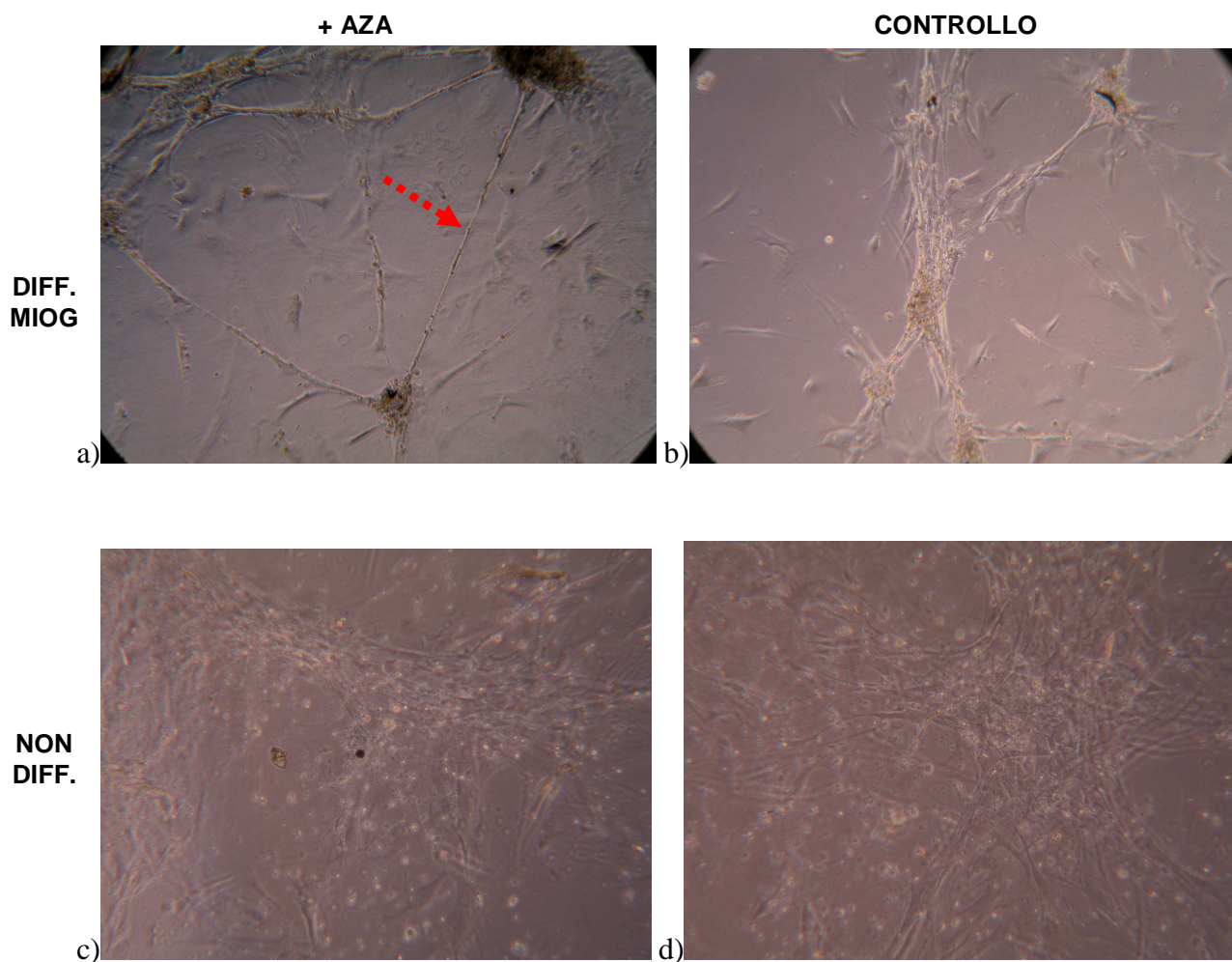
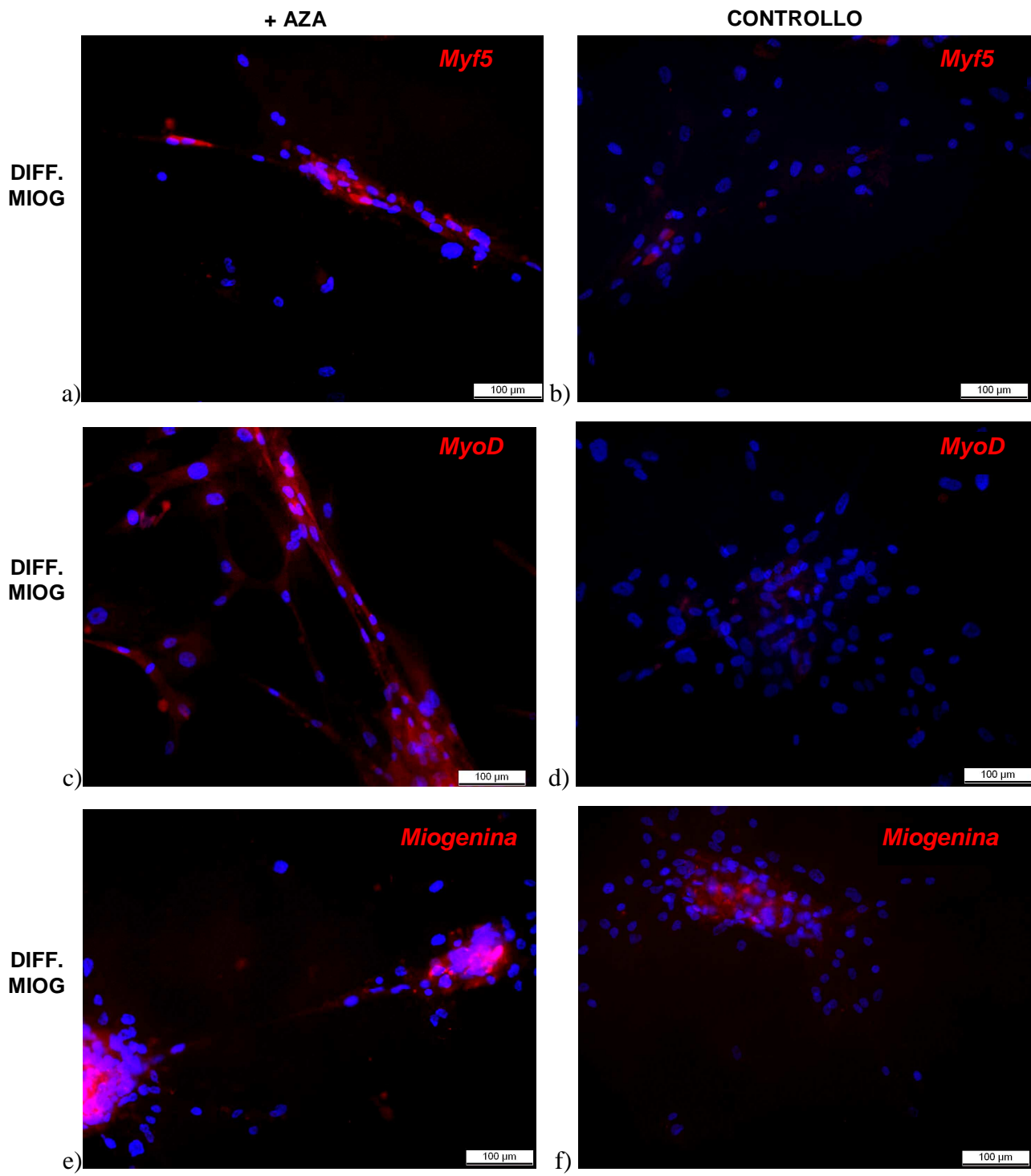


Figura 29.

Analisi morfologica al microscopio ottico con obiettivo 10X di Preadipociti commerciali trattati (a,c) e non trattati (b,d) con azacitidina 10 μ M, differenziati in senso miogenico per 3 settimane (a-b) e non differenziati (c-d).



NON
DIFF.

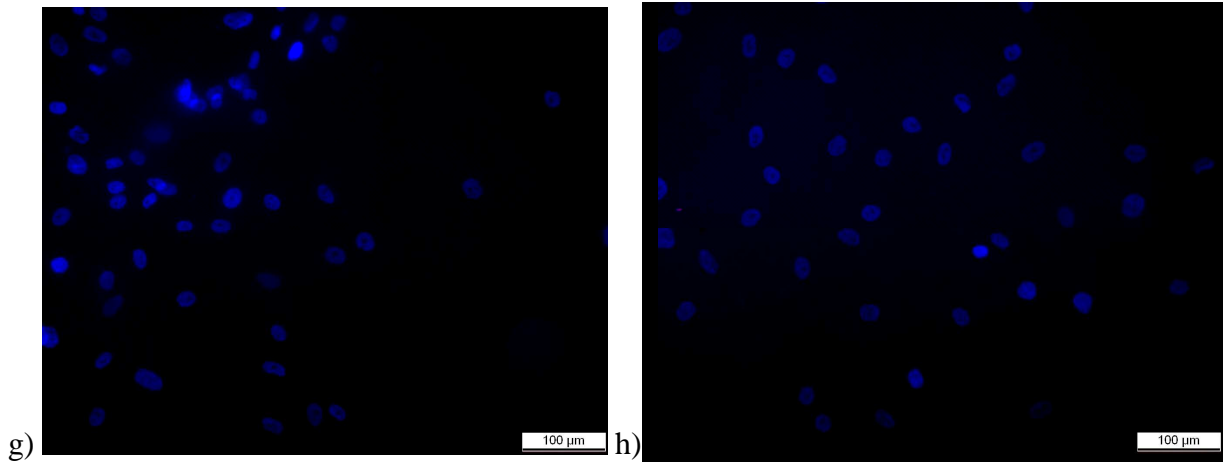


Figura 30.

Analisi in microscopia a fluorescenza dei marcatori di differenziamento miogenico (Myf5, MyoD e Miogenina) in Preadipociti commerciali trattati (a,c,e,g) e non trattati (b,d,f,h) con azacitidina 10 μ M, differenziati in senso miogenico per 3 settimane (a-f) e non differenziati (g-h). Myf5, MyoD e Miogenina sono marcati con fluorocromo Alexa 594 (rosso), i nuclei con DAPI (blu). Le immagini sono state acquisite con obiettivo 20X. Barra 100 μ m.

Anche in quest'ultimo caso lo studio di espressione genica ha confermato che l'azacitidina determinava l'UP regolazione dei geni Myf5 e MyoD. Nel caso del differenziamento miogenico si osserva che l'azacitidina produceva effetti sull'espressione genica già in cellule di generazione 3 (Figura 31-a), al contrario di quanto osservato in generazione 5 (Figura 31-b).

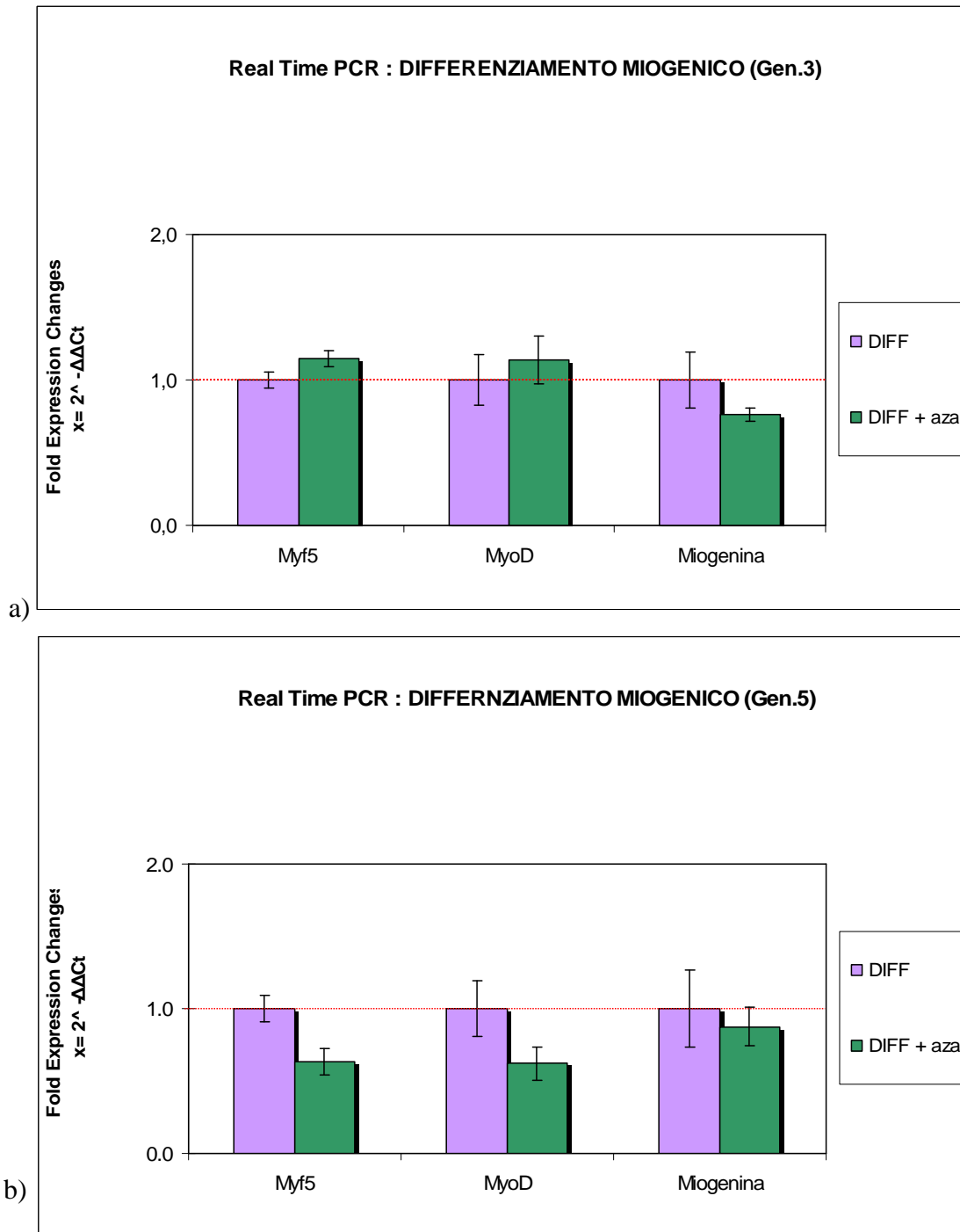


Figura 31.

Preadipociti commerciali di generazione 3 (a) e di generazione 5 (b) trattati con azacitidina 10 μ M e differenziati in senso miogenico per 3 settimane (DIFF + aza) e preadipociti di controllo non trattati con azacitidina e successivamente differenziati, DIFF). L'istogramma mostra che le cellule di generazione 3 sottoposte a trattamento demetilante sovra-esprimono i marcatori Myf5 e MyoD al 21° giorno di differenziamento.

I dati finora ottenuti lasciano ipotizzare che l'azacitidina 10 μM sia in grado di *“riprogrammare” cellule somatiche adulte*; il trattamento chimico demetilante di preadipociti estratti da soggetto sano rappresenterebbe una metodica innovativa in grado di modulare il genotipo/fenotipo cellulare allo scopo di renderlo responsivo a stimoli induttivi di tipo adipogenico, osteogenico, condrogenico e miogenico.

DISCUSSIONE

Scopo di questo lavoro è stato quello di ottenere cellule iPS virus-free utilizzando un'originale strategia protetta da brevetto internazionale N° PCT/IB2007/002204.

Cellule precursori di tessuto adiposo di soggetto sano (preadipociti) sono state estratte e coltivate in Preadipocyte Growth Medium. Contemporaneamente sono stati acquistati preadipociti commerciali estratti da tessuto adiposo sottocutaneo di soggetto sano e coltivati secondo lo stesso protocollo.

Tutte le cellule sono state caratterizzate mediante ricerca di specifici marcatori nucleari, citoplasmatici e di superficie; a tale scopo ci si è avvalsi di una serie di metodiche tra cui l'analisi citofluorimetrica, saggi citochimici (immunofluorescenza, Oil Red O) e molecolari. In seguito si è proceduto con il trattamento delle cellule con azacitidina 10 μ M per 48-96 ore. E' stato, quindi, eseguito il saggio di vitalità cellulare (MTT) e la contemporanea osservazione giornaliera mediante microscopia ottica per il monitoraggio della morfologia e della crescita cellulare. Dal saggio MTT è emerso che l'agente demetilante non esercita un'azione citotossica sui preadipociti.

Sono state, inoltre, realizzate indagini di Real Time PCR allo scopo di caratterizzare le cellule trattate e "riprogrammate" a livello molecolare: è stata, a tal proposito, constatata la sovra-espressione di geni marcatori di staminalità (OCT-4, Nanog, Sox-2) e la down-regolazione di geni tessuto specifici.

La successiva analisi effettuata mediante microscopia confocale e citofluorimetria ha permesso di definire le caratteristiche morfologiche e fenotipiche delle cellule trattate con l'agente demetilante e "riprogrammate". Dagli esperimenti effettuati è stato dimostrato che le cellule trattate con azacitidina si selezionano per specifici marcatori, che possono incrementare la loro espressione in misura compresa tra il 2,2 % (CD105) ed il 42,2% (CD90).

Infine si è dimostrato, effettuando indagini cellulari e molecolari, che l'azacitidina è un agente capace di riprogrammare preadipociti umani in cellule pluripotenti, ovvero in precursori capaci di differenziare in cellule del tessuto osseo (che producono depositi di calcio e positive ai marcatori Osteopontina e Osteocalcina), del tessuto cartilagineo (Perlecano, Aggregano e Sox-9 +) e del tessuto muscolare (Myf5, MyoD e Miogenina +). L'analisi di espressione condotta mediante Real Time PCR ha confermato che le cellule "riprogrammate" e differenziate in senso osteogenico, condrogenico e miogenico sovraesprimono i marcatori tessuto specifici considerati.

Tali risultati alimentano significative speranze di ottenere fonti alternative di popolazioni cellulari da destinare alla Medicina rigenerativa. Infatti, la riprogrammazione di una cellula somatica (quale ad esempio un preadipocita), mediante trattamento demetilante, rappresenterebbe un'importante soluzione al problema della scarsità dei donatori e consentirebbe di accedere ad una fonte inesauribile di cellule staminali autologhe di facile reperibilità e di alcuna problematicità etica. Tuttavia lo studio dei meccanismi di riprogrammazione costituisce un'area di recente scoperta e quindi molto lavoro è ancora necessario per ottimizzare la strategia per la produzione di cellule iPS, per la loro caratterizzazione, nonché per il relativo impiego in campo clinico. Inoltre la dinamica del meccanismo di riprogrammazione deve essere ulteriormente studiata: un elevato numero di copie dei geni codificanti i fattori di trascrizione coinvolti nel de-differenziamento ed elevati livelli dei rispettivi prodotti proteici sono stati osservati nelle cellule riprogrammate [50]; tuttavia, è stato dimostrato che non sono necessari alti livelli di tali fattori per il completamento del processo di riprogrammazione e ciò suggerirebbe che essi possano essere sostituiti con metodi alternativi, come l'introduzione di piccole molecole che possano imitare la loro attività.

L'uso di piccole molecole permetterebbe di ridurre le preoccupazioni relative all'uso di materiale genetico virale che potrebbe integrarsi nelle cellule utilizzate per i trattamenti clinici, portando potenzialmente allo sviluppo di tumori [51-52].

L'incertezza sulla sicurezza clinica delle cellule riprogrammate è anche potenziale fonte di preoccupazione: le cellule normalmente accumulano mutazioni nel corso della loro vita e, a maggior ragione, le iPS (che possono avere accumulato molte mutazioni nel loro genoma) potrebbero potenzialmente contribuire alla generazione di anomalie dello sviluppo. Pertanto devono essere osservate misure di salvaguardia adeguate al fine di garantire che le popolazioni di cellule iniettate siano adatte e sicure per l'uso clinico.

La tecnologia delle cellule iPS potrebbe comunque superare numerosi ostacoli tra cui quelli collegati all'impiego di ESC, ovvero la reazione immunitaria dopo il trapianto e le preoccupazioni etiche riguardanti l'impiego di embrioni umani. Il potenziale della tecnologia per la produzione di cellule iPS è enorme, ma essa è ancora nella sua prima fase di sviluppo. Per realizzare la piena applicazione delle cellule iPS, sarà essenziale migliorare le metodologie per la loro produzione e precisamente occorrerà ottenere cellule con metodiche innovative e valutare la sicurezza e l'efficacia di ogni clone e subclone prodotto.

La produzione di cellule iPS virus-free si pone, quindi, nell'ottica di superare i limiti attualmente presentati da tale tipologia cellulare (la potenziale oncogenicità, la sicurezza e l'efficacia, ecc..) e di ottenere una valida risoluzione di patologie collegate a danni tissutali mediante l'ausilio dell'Ingegneria dei Tessuti e dei Trapianti e, più in generale, della Medicina Rigenerativa.

BIBLIOGRAFIA

- 1) **Hwang, W.S., Ryu Y.J., Park J.H., Park E.S., Lee E.G., Koo J.M., Jeon H.Y., Lee B.C., Kang S.K., Kim S.J. et al.** Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*. (2004) 303, 1669–1674.
- 2) **McGuckin C., Forraz N., Baradez M.O., Basford C., Dickinson A.M., Navran S., Hartgerink J.D.** Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. *Acta Neurobiol Exp*. (2006) 66: 321-329.
- 3) **Arai F., Hirao A., Suda T.** Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *Int J Hematol*. (2005) 82, 371–376.
- 4) **Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U.** In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. (1998) 238, 265–272.
- 5) **Wakitani S., Saito T., Caplan A.I.** Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* (1995) 18, 1417–1426.
- 6) **Wickham M.Q., Erickson G.R., Gimble J.M., Vail T.P., Guilak F.** Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. (2003) 412, 196–212.
- 7) **Yen B.L., Huang H.I., Chien C.C., Jui H.Y., Ko B.S., Yao M., Shun C.T., Yen M.L., Lee M.C., Chen Y.C.** Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*. (2005) 23, 3–9.
- 8) **Kodama S., Davis M., Faustman D.L.** Diabetes and stem cell researchers turn to the lowly spleen. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005. (2005) pe2.

- 9) **Sabatini F., Petecchia L., Tavian M. , Jodon de Villeroche V., Rossi G.A., Brouty-Boye D.** Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest* (2005). 85, 962–971.
- 10) **Wiles M.V., Keller G.** Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* (1991). 111, 259–267.
- 11) **Dani C., Smith A.G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C., Ailhaud G.** Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci.* (1997) 110, 1279–1285.
- 12) **Rohwedel J., Maltsev V., Bober E., Arnold H.H., Hescheler J., Wobus A.M.** Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol.* (1994) 164, 87–101.
- 13) **Kramer J., Hegert C., Guan K., Wobus A.M., Muller P.K., Rohwedel J.** Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev.* (2000) 92, 193–205.
- 14) **Garry D.J., Masino A.M., Meeson A.P., Martin C.M.** Stem cell biology and therapeutic applications. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* (2003) 12, 447–454.
- 15) **Cohen y., Nagler A.** Umbilical cord blood transplantation- how, when and for whom? *Blood Rev.* (2004) 18, 167-179.
- 16) **Mandalam R.K., Smith A.K.** Ex vivo expansion of bone marrow and cord blood cells to produce stem and progenitor cells for hematopoietic reconstitution. *Mil Med.* (2002) 167, 78–81.
- 17) **Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A. et al.** Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* (2000). 164, 247–256.

- 18) **Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G.** Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1999). 96, 10711–10716.
- 19) **Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R. Mosca J.D. et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. (1999). 284, 143–147.
- 20) **Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M. et al.** Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. (1999). 5, 434–438.
- 21) **Napoli C., Farzati B., Sica V., Iannuzzi E., Coppola G., Silvestroni A., Balestrieri M.L., Florio A., Matarazzo A.** Beneficial effects of autologous bone marrow cell infusion and antioxidants/L-arginine in patients with chronic critical limb ischemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. (2008). 15, 709-718.
- 22) **Langer R., Vacanti J.P.** Tissue engineering. *Science*. (1993) 260, 920–926.
- 23) **Goessler U.R., Hormann K., Riedel F.** Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix. *Int J Mol Med*. (2004) 13: 505–513.
- 24) **Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I.** Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. (1996) 380: 64-6.
- 25) **Wilmut, I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. (1997) 385: 810-3.
- 26) **Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada, T.** Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol*. (2001) 11: 1553–1558.
- 27) **Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W.** Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. (2002) 416: 542–545.

- 28) **Pells S., Di Domenico A.I., Gallagher E.J., McWhir J.** Multipotentiality of neuronal cells after spontaneous fusion with embryonic stem cells and nuclear reprogramming in vitro. *Cloning Stem Cells.* (2002) 4: 331–338.
- 29) **Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K.** Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* (2005) 309: 1369–1373.
- 30) **Taranger C.K., Noer A., Sorensen A.L., Hakelien A.M., Boquest A.C., Collas P.** Induction of dedifferentiation, genome-wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell.* (2005) 16: 5719–5735.
- 31) **Takahashi K., Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* (2006) 126: 663–676.
- 32) **Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachenko R., Tchieu J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K.** Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* (2007) 1: 55–70.
- 33) **Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S.** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* (2007) 448: 313–317.
- 34) **Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., and Jaenisch R.** In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* (2007) 448: 318–324.
- 35) **Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* (2007) 131:861-72.
- 36) **Yamanaka S.** Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* (2007) 1: 39–49.

- 37) **Chen S., Do J.T., Zhang Q., Yao S., Yan F., Peters E.C., Schöler H.R. Schultz P.G., Ding S.** Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2006) 103: 17266–17271.
- 38) **Yao S. Chen S., Clark J., Hao E., Beattie G.M., Hayek A., Ding S.** Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2006) 103: 6907–6912.
- 39) **Chen S. B., Zhang Q. S., Wu X., Schultz P. G. & Ding S.** Dedifferentiation of lineage committed cells by a small molecule. *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126: 410–411.
- 40) **Xu Y., Shi Y. & Ding S.** A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature.* (2008) 453: 338-44.
- 41) **Herman J. G. & Baylin, S. B.** Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* (2003) 349: 2042–2054.
- 42) **List A. F., Vardiman J., Issa J.-P. & DeWitte T. M.** Myelodysplastic syndromes. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program).* (2004) 297–317.
- 43) **Santi D.V., Norment A., Garrett C.E.** Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1984) 81: 6993 – 6997.
- 44) **Cihak A.** Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology.* (1974) 30: 405–422.
- 45) **Momparler R.L., Momparler L.F., Samson J.** Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. *Leuk Res.* (1984) 8: 1043 – 1049.
- 46) **Egger G., Liang G., Aparicio A. & Jones P. A.** Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* (2004) 429: 457–463.

- 47) **Tomita S., Li R.K., Weisel R.D., Mickle D.A.G., Kim E.J., Sakai T., Jia Z.Q.** Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. (1999) 100: II247–II256.
- 48) **Tsuji-Takayama K., Inoue T., Ijiri Y., Otani T., Motoda R., Nakamura S., Orita K.** Demethylating agent, 5-azacytidine, reverses differentiation of embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 323: 86-90.
- 49) **Baglioni S., Francalanci M., Squecco R., Lombardi A., Cantini G., Angeli R., Gelmini S., Guasti D., Benvenuti S., Annunziato F., Bani D., Lotta F., Arancini F., Perigli G., Serio M., Luconi M.** Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J.* (2009) 23: 3494-3505.
- 50) **Park I.H., Zhao R., West J.A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T.A., Lerou P.H., Lensch M.W., Daley G.Q.** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. (2008) 451: 141-146.
- 51) **Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka S.** Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* (2008) 26: 101-106.
- 52) **Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., Le Deist F., Wulffraat N., McIntyre E., Radford I., Villeval J.L., Fraser C.C., Cavazzana-Calvo M., Fischer A.** A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* (2003) 348: 255-256.