

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 DI BIOLOGIA E MEDICINA
DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO IN INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
XXI CICLO

Tesi di Dottorato

STUDI DI RIPROGRAMMAZIONE SU CELLULE
ESTRATTE DA TESSUTO ADIPOSO

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Supervisore: Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottoranda: SILVIA FERRARO

INDICE

INDICE.....	I
ABBREVIAZIONI	IV
SOMMARIO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1. Cellule staminali.....	5
1.2. Riprogrammazione cellulare.....	5
1.3. Metilazione del DNA.....	7
1.4. L'agente demetilante 5-Azacidina.....	8
1.5. Modello sperimentale: le cellule estratte da tessuto adiposo.....	10
1.5.1. <i>L'eterogeneità nella popolazione cellulare estratta da tessuto adiposo umano</i>	10
1.5.2. <i>Marcatore di differenziamento adipogenico</i>	11
1.5.3. <i>Capacità plastica delle cellule derivate da tessuto adiposo</i>	12
1.5.4. <i>Caratterizzazione</i>	13
1.6. Scopo della ricerca.....	14
2. MATERIALI E METODI.	15
2.1. Materiali.....	15
2.1.1. <i>Modello cellulare</i>	15
2.1.2. <i>Reattivi</i>	15
2.2. Estrazione, coltura e differenziamento di cellule estratte da tessuto adiposo umano.	16
2.2.1. <i>Estrazione e Coltura</i>	16
2.2.2. <i>Differenziamento adipogenico, osteogenico e miogenico</i>	16
2.3. Saggi di citotossicità.....	17
2.3.1. <i>Test con sali di MTT per la vitalità cellulare</i>	17
2.3.4. <i>Saggio con BrDU per la proliferazione cellulare</i>	18
2.3.5. <i>Conta cellulare per l'analisi del PDL</i>	19
2.4. Analisi citochimiche	20
2.4.1. <i>Colorazione Oil Red O</i>	20
2.4.2. <i>Colorazione della fosfatasi alcalina</i>	20
2.4.3. <i>Colorazione di von Kossa</i>	21

2.5. Analisi del glicerolo extracellulare.....	21
2.6. Microscopia	22
2.6.1. <i>Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)</i>	22
2.6.2. <i>Epifluorescenza</i>	23
2.6.3. <i>Microscopia confocale a scansione laser</i>	24
2.6.4. <i>Preparazione dei campioni per l'analisi con immunofluorescenza</i>	25
2.7. Citofluorimetria	26
2.8. Western Blotting (WB).....	27
2.8.1. <i>Preparazione del campione</i>	27
2.8.2. <i>Quantificazione proteica</i>	27
2.8.3. <i>SDS-PAGE (Elettroforesi in gel di poliacrilammide)</i>	28
2.8.4. <i>Blotting</i>	28
2.8.5. <i>Rilevazione delle proteine</i>	29
2.8.6. <i>Analisi dei risultati</i>	29
3. RISULTATI	31
A. Valutazione degli aspetti morfologici e metabolici in cellule estratte da tessuto adiposo dopo trattamento demetilante	31
3.1. Coltura e caratterizzazione di cellule estratte da tessuto adiposo umano.....	31
3.1.1. <i>Isolamento di cellule-precursore dell'adipocita</i>	31
3.1.2. <i>Caratterizzazione delle cellule estratte da tessuto adiposo</i>	33
3.3. Citotossicità dell'agente demetilante 5-Azacidina	36
3.3.1. <i>Vitalità cellulare</i>	36
3.3.2. <i>Capacità proliferative</i>	37
3.3.3. <i>Espansione cellulare</i>	38
3.4. Caratterizzazione morfologica.....	41
3.4.1. <i>Microscopia ottica a contrasto di fase</i>	41
3.4.2. <i>Microscopia a scansione elettronica</i>	43
3.5. Effetto della 5-Azacidina sulla capacità di differenziamento	44
3.6. Effetto della 5-Azacidina sull'attività metabolica della cellula estratta da tessuto adiposo.....	49
B: Analisi degli aspetti molecolari	51
3.7. Caratterizzazione di cellule isolate da tessuto adiposo mediante liposuzione (PLA cells).....	51
3.7.1. <i>Caratterizzazione citofluorimetrica</i>	51
3.7.2. <i>Caratterizzazione mediante colorazione ORO e microscopia a fluorescenza</i> 53	
3.8. Caratterizzazione delle cellule espanse fino alla IV generazione.....	55
3.9. Effetti del trattamento demetilante sull'espressione di marcatori specifici in popolazione cellulare CD105+/CD90+/SREBP+/STRO1+/ORO-/ADRP-	59

3.9. Esperimento di confronto tra due popolazioni cellulari di preadipociti estratti da lipoaspirato.	65
3.9.1. <i>Caratterizzazione delle due popolazioni cellulari.</i>	66
3.9.2. <i>Risultati dell'esperimento in doppio di demetilazione</i>	68
4. CONCLUSIONI	73
BIBLIOGRAFIA	79

ABBREVIAZIONI

ADRP: *Adipose Differentiation-Related Protein*

APS: Antibiotics Penicillium–Streptomycin, antibiotici

AT, cellule: cellule derivate da Tessuto Adiposo

BCA: Acido Bicinchinonico

BrdU: Bromo-deossi-uridina, saggio di proliferazione

BSA: *Bovine Serum Albumin*

DMEM-LG: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Low Glucose*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

LPL: *Lipoprotein Lipase*

LSCM: *Laser Scansion Confocal Microscopy*, microscopia confocale a scansione laser

MTT: dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio, test di vitalità cellulare

NBCS: New Born Calf Serum, siero di vitello appena nato

ORO: colorazione Oil Red O

PBS: Phosphate-Buffered Saline, soluzione salina a base di fosfati

PDL: *Population Doubling Level*, espansione cellulare

PFA: Paraformaldeide

PLA: *processed lipoaspirate (cells)*

SEM: *Scanning Electron Microscope*

SREBP: *Sterol Regulator-Element-Binding Protein*

TA: Temperatura Ambiente

WB: *Western Blotting*

SOMMARIO

Introduzione. L'ottenimento di cellule dotate di caratteristiche differenziative di tipo pluripotente a partire da cellule somatiche adulte è reso possibile mediante manipolazione dello status epigenetico. Il processo di metilazione del DNA è responsabile dell'espressione di proteine tessuto-specifiche e del silenziamento genico di fattori di trascrizione tipici della cellula germinale o tumorale. Al contrario, è stato dimostrato che il trattamento con agenti demetilanti è in grado di indurre in cellule animali multipotenti e in cellule stabilizzate l'espressione di proteine e fattori di trascrizione presenti nella cellula germinale (hTERT, OCT4). In questo studio è stato valutato l'effetto di un trattamento demetilante in vitro su cellule umane isolate da tessuto adiposo adulto (*PLA cells*).

Materiali e metodi. Lo studio ha richiesto l'estrazione di cellule da tessuto adiposo omentale ottenuto mediante addominoplastica o liposuzione e l'analisi delle caratteristiche morfologiche e fenotipiche delle *PLA cells* mediante tecniche di microscopia ottica e a fluorescenza, citofluorimetria e Western blotting a seguito del trattamento con l'agente demetilante 5-Azacidina. Sono stati condotti studi preliminari sulla citotossicità del trattamento demetilante con saggi sull'attività delle deidrogenasi mitocondriali e sulla capacità proliferativa.

Risultati. Negli studi di citotossicità dell'agente demetilante 5-Azacidina, si è registrato una riduzione dell'attività metabolica mitocondriale nella popolazione trattata rispetto al controllo. Lo studio ha anche fornito le conoscenze per definire la concentrazione di agente demetilante rispetto al *range* riportato in letteratura.

Le popolazioni trattate con l'agente demetilante hanno mostrato sofferenza durante l'espansione generazionale; la popolazione cellulare riseminata dopo distacco enzimatico presenta un numero di cellule significativamente inferiore rispetto al campione di controllo. D'altro lato, la popolazione presenta capacità proliferativa paragonabile a quella dei campioni non trattati, durante e dopo il trattamento demetilante. I due risultati potrebbero indicare che il trattamento demetilante non influisca sulla proprietà replicativa della cellula, ma ne riduca la capacità di adesione nella coltura in monostrato dopo il cambio generazionale.

Poiché le *PLA cells* sono in grado di differenziare in altre tipologie cellulari, sono stati condotti studi di differenziamento in senso adipogenico, osteogenico e miogenico su popolazioni tratte in precedenza con l'agente demetilante. Il confronto con la risposta agli stimoli differenziativi di cellule non trattate ha dimostrato che l'agente demetilante non ha modificato la capacità differenziativa.

Le indagini di microscopia a fluorescenza e Western blotting hanno mostrato che il fattore di trascrizione tessuto-specifico SREBP, presente nelle popolazioni di origine, è ugualmente espresso dopo il trattamento con 5-Azacidina. La ricerca dei fattori di trascrizione NANOG e OCT4, responsabili della capacità di *self-renewing* nelle cellule pluripotenti non ha dato risultati positivi. Le cellule trattate con 5-Azacidina sono state mantenute in coltura ed espanse, per valutare un eventuale rimodellamento proteomico nelle cellule replicate, ma non è stata registrata espressione dei due marcatori nucleari.

Gli studi di caratterizzazione condotti con immunofluorescenza confocale e analisi citometriche hanno dimostrato che la popolazione cellulare isolata da tessuto adiposo è eterogenea. E' stato osservato che, l'espansione generazionale determina un arricchimento nella componente cellulare CD90+/CD105+/CD29+, e cioè una popolazione con forti analogie fenotipiche con le cellule staminali stromali del midollo osseo, a scapito delle cellule endoteliali ed ematopoietiche presenti in origine. Inoltre, le cellule mantenute in coltura perdono il segnale dell'ADRP, proteina associata al *commitment* adipogenico, ed esibiscono una deplezione delle vescicole adipose citoplasmatiche, mentre è stato osservato nelle cellule di terza e quarta generazione la comparsa del marcatore di staminalità mesenchimale STRO1, espresso unicamente nella frazione stromale delle cellule staminali estratte da midollo osseo.

Conclusioni. *PLA cells* di origine umana non si comportano in vitro dopo trattamento demetilante come le corrispondenti cellule di origine animale e cioè non sembrano essere in grado, nelle condizioni sperimentali usate in questo studio, di essere riprogrammate ad un fenotipo diverso da quello di origine. Questo risultato pone il problema dello stato di metilazione del DNA nelle cellule isolate da tessuto adiposo che mantenute a lungo *in vitro* assumono il fenotipo CD105+/ CD90+/STRO1+/ADRP-, e se un trattamento che preveda l'associazione di diversi agenti demetilanti/deacetilanti in combinazione con fattori di crescita possa realizzare in queste cellule una reale riprogrammazione funzionale in vitro.

ABSTRACT

Introduction. In the late few years reprogramming studies were undergone on somatic cells to get insight into the epigenetic mechanisms of cell differentiation and developmental biology. DNA methylation was identified as having crucial role on the expression of tissue-specific proteins and in gene silencing of embryonic transcriptional factors. On the other hand, demethylation treatments exhibited to be successful in restoring hTERT and OCT4 in animal models and stabilized cell lines. The aim of this study was to investigate the effects of demethylation treatment on somatic cells isolated from human adipose tissue.

Materials and methods. In this work, tissue samples from liposuction or abdominoplastic surgery were processed for cell isolation. Optical microscopy and immunofluorescence, together with cytofluorimetric analysis and further western blotting indages were performed to collect informations regarding morphological and hymmunophenotypical features. Preliminary studies were carried out on mitochondrial dehydrogenases activity and proliferative capacity to estimate the cytotoxicity of the demethylation treatment.

Results. The out come of cytotoxic analysis was a reduction of mitochondrial activity in treated cells, compared to untreated cells. Furthermore, we obtained indications of working concentration of the demethylation agent.

Cell suffering was observed during clonal expansion in populations treated with demethylation agent. Differences on the harvested cell number resulted between treated and control sample, since lower number was registerd for the demethylated population

On the other hand, both treated end untreated samples showed comparable proliferative capacity, during and after the incubation time with demethylation agent. Taken together, the last two results give rise the hypothesis that the demethylation treatment may reduce cell adhesion in monolayer culture after clonal expansion, more than affecting the proliferative capacity.

No differences between treated and untreated cell samples were observed with phase contrast optical microscopy regarding cell complexity and distribution and with electronic scansion microscopy concenring dimension and cell spreading.

Cells isolated from adipose tissue are able of multipotency. Thus, adipogenic and osteogenic differentiation studies were carried out to evaluate whether 5-Azacytidine could affect the differentiation ability of adipose-derived cells, but no differences were observed between treated differentiated and untreated differentiated.

The expression of the adipose tissue-specific transcriptional factor SREBP, was evaluated with fluorescence microscopy and western blotting. SREBP signals were registered in treated cells as well as in the population of origin. The research of the transcriptional factors NANOG and OCT4, responsible of stem cell self-renewing in pluripotent cells, didn't get positive results, even in those populations long cultured and expanded after the treatment.

Characterization studies with immunofluorescence techniques were undergone on freshly isolated from adipose tissue. Cytometric data revealed the presence of diverse cell lineages that were lost during the cell expansion. By contrast an enrichment of the cell component, described elsewhere as bone marrow stem population, CD105+/CD90+/CD29+, was observed in the III and IV generations.

In long-cultured adipose tissue-derived cells was registered lost of adipose tissue-specific marker ADRP as well as the depletion of cytoplasmatic adipose vesicles. The investigation with confocal microscopy and western blotting revealed no modifications in the expression of ADRP and CD105 markers in 5-Azacytidine treated cells, while new signal of STRO1 related to the bone marrow-derived stem cells, was detected in long cultured adipose-derived cells, in treated as well untreated sample.

Conclusions. No positive results were obtained through demethylation treatment of human adipose-derived cells with 5-Azacytidine, in contrast to the experiences with animal cell models. Would be extremely interesting to get insight into the methylation level of DNA for defined factors in the long-cultured adipose-derived cells CD105+/CD90+/STRO1+/ADRP-. Moreover, new approach with association of a variety of demethylation agents in association with stem growth factors may give interesting results.

1. INTRODUZIONE

1.1. Cellule staminali

Le cellule staminali di origine embrionale (ES), capaci di differenziare in tutti i tipi di tessuto umano, hanno delineato la possibilità di un utilizzo clinico, mediante trapianto cellulare o tessutale, per quelle patologie di difficile risoluzione per la medicina tradizionale (malattie autoimmunologiche, cardiopatie, diabete, etc...). Le ES però, oltre alle difficoltà sperimentali legate a questioni etiche, hanno la tendenza ad indurre la formazione di tumori benigni (teratomi) nel sito di trapianto e, se questo non bastasse, la loro coltura in vitro è molto instabile (Stojkovic, et al. 2004; Reubinoff, et al. 2000).

A differenza delle ES, le cellule staminali da tessuto adulto (AS) non sono pluripotenti, ma presentano diversi vantaggi: possibilità di trapianto di cellule autologhe, numerosità delle fonti e, non da meno, la possibilità di utilizzare queste cellule con minori problematiche di tipo etico. D'altro lato risulta difficile isolare le AS da tessuto, perché sono estremamente rare rispetto alla popolazione cellulare complessiva ed inoltre, i tentativi di far replicare queste cellule mantenendole indifferenziate non hanno dato risposte incoraggianti (Wagers, et al. 2004).

Fra le nuove strategie per evitare il ricorso a embrioni, trovano posto gli studi sulla cosiddetta de-differenziazione cellulare, un procedimento che mira a riprogrammare una cellula adulta per riportarla allo stadio di cellula staminale pluripotente e poterla così utilizzare per riparare un tipo di tessuto qualunque, anche diverso da quello della cellula di origine (Chen, et al. 2004; Chen, et al. , 2006).

1.2. Riprogrammazione cellulare

Diversi esperimenti sono stati condotti con l'obiettivo di studiare e approfondire i meccanismi genetici e biomolecolari che controllano l'evoluzione cellulare. Grazie a questi è stato possibile osservare l'importanza dell'ambiente citoplasmatico per l'espressione dell'informazione genomica contenuta nel nucleo (Kono T, 1997), e scoprire fattori di trascrizione cruciali per il mantenimento di caratteristiche staminali

(Takahashi, et al. 2007).

La tecnica, nota con l'acronimo SCNT (somatic cell nuclear transfer) o clonaggio, consiste nel trasferimento del nucleo di una cellula somatica nell'ambiente citoplasmatico di una cellula germinale/embrionale privata del proprio nucleo. In modelli animali, l'esposizione della cromatina all'ambiente citoplasmatico primitivo di un ovocito rende possibile la riprogrammazione del DNA (KonoT, 1997), con variazione nell'espressione genica e nella potenzialità di differenziamento (Alberio, et al. 2006; Morgan, et al. 2005). E' ormai appurato che il successo del clonaggio di animali, partendo da una cellula somatica, dipende dall'abilità dei fattori citoplasmatici dell'ovocito di rimuovere le informazioni epigenetiche dal nucleo impiantato; questa funzione è naturalmente svolta dal citoplasma dell'ovocito nella fase della fertilizzazione (Wilmut, et al. 1997; Beaujean, et al. 2004). Negli animali, infatti, il citoplasma dell'ovocito, una volta incorporato il nucleo dello spermatozoo, procede al rimodellamento della cromatina e alla riprogrammazione del genoma spermatico, riducendo la quantità di DNA metilato. La fase di demetilazione del genoma si mantiene fino alla formazione della blastocisti, riconosciuta come stadio epigenetico totipotente; successivamente, avviene una nuova metilazione del DNA, quale fenomeno di imprinting genomico, che indirizza la cellula verso lo stadio staminale pluripotente e, in seguito, verso il differenziamento nelle diverse tipologie cellulari (Morgan, et al. 2005; Mann, et al. 2002).

La riprogrammazione cellulare per trasferimento del nucleo (SCNT) e la produzione di ibridi, mediante fusione cellulare tra cellula somatica ed embrionale, (Tada, et al. 2001) hanno dato evidenze della possibilità di restituire caratteristiche di pluripotenza ad un nucleo somatico (Hochedlinger, et al. 2006). Sebbene non si conoscano a pieno i meccanismi molecolari della riprogrammazione nucleare, gli esperimenti di fusione cellulare hanno fornito la possibilità di identificare fattori di trascrizione propri delle cellule staminali embrionali, fattori che potrebbero essere utilizzati direttamente sulle cellule somatiche per indurne la riprogrammazione.

Gli scienziati giapponesi Takahashi e Yamanaka hanno scelto razionalmente 24 geni, noti perché in grado di dare alle cellule staminali embrionali la loro caratteristica di pluripotenza, e li hanno utilizzati su cellule somatiche. Dei 24 geni saggiati, 4 hanno mostrato di far regredire i fibroblasti adulti: l'espressione dei fattori di trascrizione OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 in fibroblasti, mediata da retrovirus, ha modificato la

morfologia cellulare, la capacità proliferativa, l'espressione di marcatori superficiale ed ha indotto in queste cellule la capacità pluripotente staminale, da cui il nome *induced pluripotency stem (iPS) cells* (Takahashi, et al. 2006). Nelle cellule iPS, un'analisi approfondita dei fattori di trascrizione OCT4 e NANOG, notoriamente responsabili delle capacità di *self-renewing* nelle cellule pluripotenti, ha rilevato che lo stato di metilazione nelle regioni genomiche promotrici corrisponde in parte al *pattern* somatico, in parte a quello embrionale (Maherali, et al. 2007). Oltre a questo, rimane il dubbio della possibilità di un utilizzo clinico di cellule trattate con retrovirus; d'altro lato la ricerca sulle cellule iPS ha stimolato l'interesse per i meccanismi molecolari basilari coinvolti nello sviluppo fetale ed ha permesso di approfondire gli eventi epigenetici, quali la modificazione della cromatina, l'acetilazione e la metilazione del DNA (Reik W, 2007; Okita, et al. 2007; Tsumura, et al. 2006).

1.3. Metilazione del DNA

La metilazione del DNA consiste nel trasferimento di un gruppo metilico dalla S-adenosil-metionina (SAM) alla posizione 5 della citosina, nel dinucleotide citidina-guanidina (CpG), per opera dell'enzima DNA metiltrasferasi (DNMT) (Araujo, et al. 2001; Siegfried, et al. 1997; Gabbara, et al. 1995). Come risultato del trasferimento del metile, la SAM è convertita a S-adenosil-omocisteina (SAH), come illustrato nella Figura 1.1.

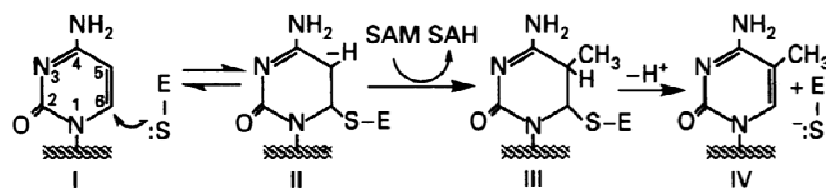


Figura 1.1. Meccanismo di metilazione della citosina (Gabbara S, 1995). L'enzima DNMT (rappresentato con il gruppo nucleofilo :S-E) lega in modo reversibile il nucleotide, in posizione 6 dell'anello piridinico, e favorisce il trasferimento del metile dalla S-adenosil-metionina alla posizione 5 della citidina.

Nell'adulto, il genoma umano contiene circa 45000 regioni a densità elevata di dinucleotidi CpG che sono per metà associate ai geni *housekeeping* e per metà ai geni

tessuto-specifici (Antequera, et al. 1993). La possibilità di intervenire sullo stato di metilazione del DNA, ha interessato distinte linee di ricerca, tra cui lo sviluppo di chemioterapici, capaci di riattivare i geni soppressori della proliferazione tumorale (Guo, et al. 2006; Sakashita, et al. 1997), produzione di fattori differenziativi (Tsuji-Takayama, et al. 2004) e inibitori della condensazione cromatinica (Haaf, et al. 2000).

1.4. L'agente demetilante 5-Azacidina

L'interesse per gli agenti modificanti la cromatina, come gli ipometilanti o gli inibitori della deacetilase istonica, ha preso piede negli ultimi anni, per poter conoscere e controllare le modificazioni epigenetiche indotte con le diverse tecniche di riprogrammazione, quali SCNT e fusione cellulare (Haaf, et al. 2000). A tal fine, è stato studiato l'effetto dell'agente demetilante 5-azacidina sull'espressione di fattori specifici della cellula differenziata (Kumar, et al. 2006; Eilertsen, et al. 2007), o staminale (Devereux, et al. 1999; Tsuji-Takayama, et al. 2004), utilizzando modelli cellulari animali. L'azione della 5-Azacidina è stata associata e confrontata con l'effetto di altri *chromatin modifiers*, quali l'Acido Retinoico tutto-TRANS (ATRA), agente demetilante, con meccanismo d'azione diverso da quello della 5-Azacidina, e la Tricostatina (TSA), noto inibitore della deacetilase istonica.

La 5-Azacidina è un noto farmaco antitumorale, usato nella sindrome mielodisplasica; essa, infatti, inibisce la crescita cellulare ed induce l'apoptosi in alcuni tipi di cellule tumorali (Poirer, et al. 2001; Murakami, et al. 1995; Li, et al. 1970). E' ampiamente utilizzata come fattore differenziativo in senso miogenico; a metà degli anni '70, i ricercatori americani Taylor e Costantinides hanno esplorato, la capacità differenziativa della 5-Azacidina su fibroblasti murini di linea C3H/10T1/2CL8 e 3T3, sviluppando cellule muscolari striate contrattili, condrociti ed adipociti, con caratteristiche biochimiche modificate rispetto alle cellule di partenza, già a pochi giorni dall'esposizione alla 5-Azacidina (Taylor, et al. 1979; Constantinides, et al. 1978).

L'azione demetilante della 5-Azacidina è dovuta alla sua analogia strutturale con il nucleotide pirimidinico citidina (Figura 3.2); essa agisce in maniera specifica durante la fase S del ciclo cellulare, sostituendosi alla citidina nella replicazione del DNA ed inibendo l'attività della metiltransferasi del DNA (DNMT) (Gabbara, et al.

1995; Christman JK, 2002).

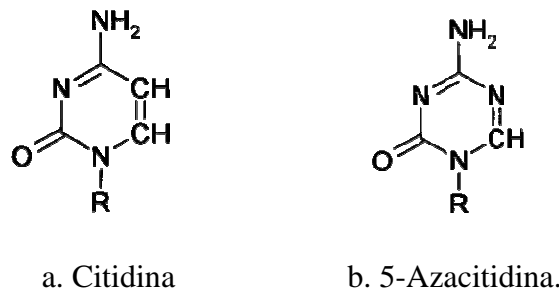


Figura 1.2. Struttura chimica di Citidina e di 5-Azaciditidina. Il derivato della citidina presenta sostituzione del carbonio con azoto nella posizione 5 dell'anello pirimidinico.

Una volta entrata nella cellula, l'agente demetilante 5-Azaciditidina è trasformata nella forma trifosfato e incorporata nel DNA, dove agisce come inibitore della citosina-5-metil-transferasi. L'enzima lega covalentemente l'analogo nucleotidico e non riesce a portare a termine la reazione di trasmetilazione, perché il gruppo amminico 5-Azaciditidina non è sufficientemente nucleofilo (Gabbara, et al. 1995). La formazione della triade DNA-Azaciditidina-DNMT è un meccanismo non competitivo che spiega l'alta efficacia di questo agente demetilante, rispetto al suo derivato 5-azadeossicitidina.

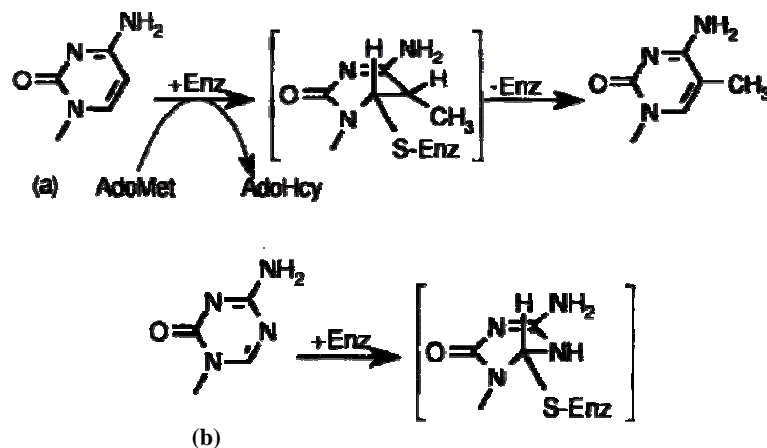


Figura 1.3. Reazione di metilazione, coordinata dall'enzima DNA metil-trasferasi (Enz), in presenza di S-adenosil-metionina (AdoMet), e sui substrati Citidina (a) e 5-Azaciditidina (b). Il legame covalente che si instaura tra l'enzima DNMT e la 5-Azaciditidina è di tipo covalente, perciò l'intermedio di reazione rimane bloccato e non si espleta la metilazione come avviene per la citidina (Christman JK, 2002).

La letteratura riporta diversi studi sulla capacità della 5-Azacidina di influenzare le caratteristiche biochimiche e morfologiche in modelli cellulari animali e molti sono i trials clinici sull'attività antitumorale su cellule di tipo mieloide. Mentre non si conosce l'effetto dell'agente demetilante su colture di cellule umane specializzate come le cellule estratte da tessuto adiposo. La cellula precursore dell'adipocita, è facilmente isolata dal tessuto adiposo sottocutaneo e, per le sue proprietà plastiche, è di notevole interesse nell'ambito della medicina rigenerativa.

1.5. Modello sperimentale: le cellule estratte da tessuto adiposo

Nel tessuto adiposo gli adipociti maturi rappresentano il terzo o i due terzi del numero totale di cellule. Il resto è composto da cellule del sangue di vario tipo: cellule endoteliali, periciti, precursori degli adipociti nei diversi stadi di differenziamento, e, infine, cellule con morfologia fibroblastoide. I precursori degli adipociti sono descritti come cellule interstiziali, oppure mesenchimali non differenziate o poco differenziate, o anche cellule mesenchimali prive di accumuli lipidici. Secondo il quadro epigenetico, è riconosciuto che i precursori degli adipociti derivino da cellule multipotenti, che evolvono ad adipoblasti unipotenti; il *commitment*, cioè il processo di acquisizione di caratteristiche tessuto-specifiche, degli adipoblasti porta alla tipologia cellulare dei preadipociti, definiti come cellule che esprimono marcatori precoci di differenziamento, e che non presentano i depositi lipidici tipici dell'adipocita (Ailhaud, et al. 1992).

1.5.1. L'eterogeneità nella popolazione cellulare estratta da tessuto adiposo umano

Diversi studi di caratterizzazione sono stati pubblicati, per fornire un quadro chiaro sulle componenti cellulari del tessuto adiposo. Infatti, molto spesso si descrive che dalla frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo è possibile estrarre cellule staminali, che presentano caratteristiche fenotipiche e plastiche simili alle cellule staminali mesenchimali estratte da midollo osseo (Gronthos, et al. 2001). In seguito alla digestione enzimatica di tessuto adiposo da lipoaspirato, si ottiene una miscela di cellule da cui è possibile isolare, mediante la tecnica MACS (magnetic cell separation), diverse popolazioni cellulari; in particolare, la ricerca dei marcatori CD34 e CD31 (propri delle cellule endoteliali, dei monociti/macrofagi e piastrine) e del CD14

(marcatore di monociti/macrofagi e granulociti), ha chiarito che, relativamente a questi marcatori, la frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo è composta da cellule endoteliali CD34+/CD31+, da macrofagi, residenti o infiltrati, CD14+/CD31+, e da precursori degli adipociti CD34+/CD31- (Sengenés, et al. 2005).

Con l'aiuto di marcatori del metabolismo di cellule differenziate è stato possibile osservare che i preadipociti perdono la capacità proliferativa col loro differenziamento a cellule mature; lo studio incrociato di proliferazione, mediante l'intercalante del DNA H³-timidina, e dell'attività della glicerolo-3-fosfato deidrogenase (GPDH), un marcatore tardivo di differenziamento adipogenico, ha dimostrato che nelle cellule che accumulano trigliceridi l'indice di intercalazione della H³-timidina decresce notevolmente all'aumentare dell'attività metabolica del GPDH. (Ailhaud, et al. 1992)

Il differenziamento cellulare porta le cellule embrionali ad acquisire identità distinte e funzioni specializzate; una cellula differenziata si distingue per l'espressione genetica, la produzione di proteine specifiche, la funzione e la morfologia.

1.5.2. Marcatori di differenziamento adipogenico

Il processo di specializzazione dei preadipociti è stato studiato sulle cellule stabilizzate 3T3L1, 3T3F442A, o TA-1 di origine murina, in grado di rispondere agli stimoli adipogenici. Dopo aver raggiunto la confluenza, le cellule fibroblastoidi vanno incontro a cambiamento morfologico: la cellula si arrotonda, si allarga ed accumula trigliceridi nelle vescicole citoplasmatiche. Più che il contatto tra cellule, l'elemento basilare per il *commitment* e l'avvio al differenziamento adipogenico, sembra sia l'arresto della crescita della cellula nella fase G₁/S del ciclo cellulare. Il *commitment* è associato alla comparsa dell'attività della lipoproteina lipase (LPL) e all'assorbimento di acidi grassi liberi; la LPL idrolizza i trigliceridi circolanti, liberando gli acidi grassi che sono assorbiti dalla cellula ed esterificati al glicerolo-3-fosfato. Entrambe le attività, enzimatica e di esterificazione, sono stimulate dall'insulina (Frayn, et al. 2003; Ailhaud, et al. 1992).

Prima ancora della comparsa dell'attività della LPL e della stimolazione degli acidi grassi, è stata riportata la presenza di ADRP (*adipocyte differentiation-related protein*); questo marcatore presente nel preadipocita è un polipeptide, associato all'immagazzinamento dei trigliceridi e identificato come il maggior componente della membrana che ricopre i globuli di grasso, in diverse tipologie cellulari, quali adipociti, epatociti (Steiner, et al. 1996) e cellule epiteliali escrettrici dell'epitelio mammario

(Heid, et al. 1996). Nei preadipociti di topo 3T3L1 dopo 24 ore di incubazione con fattori adipogenici, l'mRNA dell'ADRP aumenta di 100 volte; mentre in tempi più lunghi di differenziamento l'ADRP è sostituita da un'altra proteina in grado di legare i lipidi, la Perilipina (Heid, et al. 1998; Brasaemle, et al. 1997).

Il processo di differenziamento adipogenico, o adipogenesi, è stato intensamente studiato *in vitro* per identificare gli aspetti cruciali del passaggio da preadipocita a cellula matura, ma molti sono i segnali ormonali e nutrizionali che regolano la maturazione degli adipociti *in vivo*.

1.5.3. Capacità plastica delle cellule derivate da tessuto adiposo

Le cellule derivate da tessuto adiposo, definite "*processed lipoaspirate cells*" or PLA cells, sono considerate multi-potenti, perché capaci di differenziare in senso adipogenico, condrogenico, osteogenico e miogenico. Questa capacità multipotente, unito alla facilità di prelievo e all'abbondanza delle cellule ottenibili da un campione di liposuzione, ha aumentato l'interesse per le cellule PLA per il loro possibile utilizzo clinico nel campo dell'ingegneria tissutale della medicina rigenerativa (Freitas, et al. 2006; Aust, et al. 2004).

Il midollo osseo è stato considerato la fonte principale di cellule mesenchimali staminali, perché fornisce cellule indifferenziate molto proliferative, in grado di replicare in modo simmetrico, e con capacità differenziativa pluripotente (Pittenger, et al. 1999; Kern, et al. 2006). A causa delle difficoltà nel recupero dei campioni tissutali e per la variabilità della responsività cellulare dovute principalmente all'età del donatore, si è cercata una fonte alternativa di cellule staminali, nel sangue del cordone ombelicale e nel tessuto adiposo (Kern, et al. 2006; Mizuno, et al. 2003; Aust, et al. 2004).

Diversi lavori hanno dimostrato l'efficacia del differenziamento in cellule derivate da tessuto adiposo, paragonabile alle cellule estratte da midollo osseo (Moriscot, et al. 2005; Freitas, et al. 2006; Zuk, et al. 2002; Taylor, et al. 1979). Il midollo osseo, infatti, contiene un'unica popolazione di cellule stromali multi-potenti, che sono in grado di rispondere a stimoli differenziativi in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico; queste cellule sono comunemente descritte dai marcatori di superficie CD105, CD90, CD29, CD34 e CD44, che si trovano espressi anche nelle cellule stromali derivate dal tessuto adiposo. Mentre risulta negativa la ricerca degli antigeni CD14, CD45, CD31 che caratterizzano le cellule staminali ematopoietici

derivate da midollo osseo (Lee, et al. 2004; Kern, et al. 2006; Mitchell, et al. 2006; Boquest, et al. 2005).

Confrontando i dati di caratterizzazione delle cellule derivate da tessuto adiposo con le cellule staminali da midollo osseo si trovano delle note comuni, come l'espressione di CD105 e CD34 (Pittenger, et al. 1999). Nel 1991 è stato pubblicato un lavoro da qui poi avrebbero preso spunto altri gruppi di ricerca (Simmons, et al. 1991). L'obiettivo prevedeva di sviluppare uno strumento in grado di discriminare, tra le cellule derivate da midollo osseo, le cellule staminali stromali (CD34+); i ricercatori hanno costruito un anticorpo che prende il nome dal *target*, lo STRO1 e che lega una sottopopolazione CD44+/CD34+/CD29+. La popolazione riconosciuta dallo STRO1 e quindi selezionata, cresce *in vitro* come colonie, anche dette *colony forming unit-fibroblast* (CFU-F), in monostrato adesivo; queste CFU-F presentano caratteristiche fenotipiche riconosciute anche nei fibroblasti, negli adipociti e nelle cellule muscolari.

Il profilo proteomico delle cellule stromali del tessuto adiposo non è identico a quello riportato in letteratura per le stromali derivate da midollo osseo, perché solo queste ultime sono riconosciute dal marcatore STRO1, per cui, in verità, risultano positive soltanto il 3-5% delle cellule totali (Simmons, et al. 1991; Gronthos, et al. 2001).

1.5.4. Caratterizzazione

Riassumendo le note di caratterizzazione raccolte nei diversi lavori pubblicati, è possibile distinguere i preadipociti, quali cellule *committed* in senso adipogenico, dalla componente eterogenea presente nella popolazione isolata da tessuto adiposo umano.

Innanzitutto, i preadipociti presentano marcatori associati all'attività regolatrice, quali fattori di trascrizione adipogenici, tra cui lo *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP)-1 (Shimano H, 2001), il CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- α e il PPAR γ (Gregoire, et al. 1998). Al precursore si associa l'espressione dell'ADRP, marcatore specifico dell'accumulo di lipidi, nella fase iniziale del differenziamento adipogenico (Heid, et al. 1996). Infine, queste cellule presentano alcuni marcatori di superficie e sono normalmente descritte come CD90+/CD105+/CD31-/CD34+/CD14-.

Ma la composizione cellulare della popolazione isolata da tessuto adiposo presenta positività ai marcatori ematopoietici ed endoteliali. Infatti, durante lo sviluppo embrionale del tessuto adiposo, è stata osservata aggregazione, in forma di masse dense, di cellule mesenchimali prive di accumuli lipidici, associata ad una rete

vascolare capillare. In seguito, le cellule formano delle strutture ordinate a ridosso dei capillari, aumentano le loro dimensioni con l'accumulo di trigliceridi, e si circondano di tessuto mesenchimale organizzato (Ailhaud, et al. 1992).

1.6. Scopo della ricerca

La popolazione cellulare ottenuta da tessuto adiposo umano è costituita da cellule fibroblastoidi con capacità proliferativa e differenziativa comparabili a quelle descritte per le cellule estratte da midollo osseo. In seguito alla digestione enzimatica del tessuto adiposo si ottiene una popolazione eterogenea che dopo alcuni giorni in coltura, risponde agli stimoli differenziativi adipogenici. Esse risultano positive ai marcatori di staminalità mesenchimale (CD90, CD105), come per le cellule derivate dal midollo osseo; sono CD31+ e CD34+, e presentano altri marcatori, quali, α -actina (propria delle cellule della muscolatura liscia), CD29 (Integrina- β). Ma le cellule da tessuto adiposo non legano lo STRO1, marcatore che distingue le cellule stromali staminali mesenchimali del midollo osseo.

Lo scopo della ricerca è di studiare l'effetto di un trattamento demetilante sulle cellule estratte da tessuto adiposo, valutando la capacità differenziativa e l'attività metabolica, oppure la variazione degli antigeni di superficie o dei fattori proteici presenti nel precursore dell'adipocita.

L'ipotesi è che il trattamento demetilante possa indurre modificazioni cromatiniche e genomiche, apportando quindi variazioni sull'espressione delle proteine tessuto-specifiche. A questo scopo sono stati valutati i marcatori CD31, CD34, CD90, CD105, espressi parzialmente nella popolazione cellulare di origine; la proteina ADRP e il fattore di trascrizione SREBP, quali marcatori tessuto-specifici. Per ricercare l'effetto di riprogrammazione genica in seguito al trattamento demetilante è stata condotta un'indagine sull'affinità dello STRO1, specifico marcatore di staminali stromali mesenchimali da midollo osseo, e sull'espressione dei fattori di trascrizione embrionali, NANOG ed OCT4. Si attendono, inoltre, effetti della eventuale demetilazione sulle capacità della popolazione estratta da tessuto adiposo di rispondere ai fattori differenziativi e sull'attività metabolica legata alla lipoproteina lipase, presente nei precursori degli adipociti.

2. MATERIALI E METODI

2.1. *Materiali*

2.1.1. **Modello cellulare**

Le cellule utilizzate per gli esperimenti di demetilazione sono popolazioni cellulari, ottenute per digestione enzimatica di tessuto adiposo umano. I campioni di tessuto adiposo umano utilizzato sono stati per donati da pazienti obesi del Reparto di Chirurgia dell'Obesità dell'Ospedale S. Luca di Trecenta (RO), in parte sono campioni ottenuti per liposuzione in soggetti sani in ambito di Chirurgia estetica. I soggetti obesi di età compresa tra i 35 e i 55 anni, maschi e femmine, e i soggetti sani 25-30 anni e sesso femminile, hanno acconsentito alla sperimentazione scientifica. E' stata acquistata dalla ditta Lonza una popolazione cellulare derivata da digestione enzimatica di un campione di tessuto adiposo omentale ottenuto per liposuzione in ambito di Chirurgia Plastica (cod. PT5001). Inoltre, è stata utilizzata una popolazione cellulare stabilizzata di origine murina 3T3L1 (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna), nota per le caratteristiche fibroblastoidi e perché in grado di rispondere agli stimoli adipogenici (Green H 1975).

2.1.2. **Reattivi**

La maggior parte dei sali impiegati per la biologia cellulare e dei reagenti per la preparazione dei campioni per la microscopia e per il Western Blotting (sodio cloruro, sodio fosfato monobasico e bibasico, potassio cloruro, potassio fosfato mono e bibasico, acido cloridrico, EDTA, PFA, SDS, acrilamide/bisacrilammide, b-mercptoetanololo, TRIS, isopropanolo, metanolo, etc etc) sono stati acquistati dalla ditta Sigma Aldrich.

Per i saggi di citotossicità sono stati utilizzati i prodotti: MTT della ditta Sigma (cod. M2128); la determinazione del glicerolo extracellulare è stata condotta con il Free Glycerol Reagent (cod. TR0100) e con la soluzione standard di Glicerolo (cod. G7793) entrambi prodotti Sigma.

I sieri e la miscela antibiotica/antimicotica per la coltura cellulare, la Collagenase IA, i fattori differenziativi (insulina, indometacina, desometasone, isobutil-meti-

xantina, acido b-glicerofosfato, etc etc) e i sali utilizzati per la citochimica (Oil Red O, Ematossilina, Fast Blue BB, Naftolo AS MX etc etc) sono prodotti Sigma.

Per la biologia cellulare è stato utilizzato materiale plastico della ditta BD Falcon.

Di altri materiali è stata specificata la provenienza commerciale nel testo.

2.2. Estrazione, coltura e differenziamento di cellule estratte da tessuto adiposo umano.

2.2.1. Estrazione e Coltura

L'isolamento di cellule precursori degli adipociti è stato condotto secondo la metodica ampiamente conosciuta in letteratura, con minime variazioni alla concentrazione dell'enzima Collagenase IA (Mitchell, et al. 2006; Zuk, et al. 2002). Il pezzo chirurgico di derma omentale ottenuto mediante addomino-plastica è stato lavato con PBS, disinfettato con tintura iodata Betadine (Esoform), e lavato nuovamente con PBS per allontanare la soluzione disinfettate. Il tessuto adiposo è stato disseccato dallo strato cutaneo e dalla componente fibrotica; i globuli lipidici, così ottenuti, sono stati sminuzzati in piccoli frammenti e digeriti per 45minuti in bagno agitato a 37°C, con enzima Collagenase IA, alla concentrazione 0,1% in terreno base DMEM-LG, e in rapporto enzima:tessuto 1:1 (V/V). L'azione della Collagenasi è stata neutralizzata con ugual volume di DMEM-LG (Gibco, cod. 22320) contenente NBCS 20%. Separata la porzione di grasso, la sospensione è stata centrifugata a 300g per 10minuti; il pellet è stato recuperato e lavato con DMEM-LG contenente NBCS 20% e APS 1%, quindi centrifugato a 300g per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in terreno proliferativo, DMEM, NBCS 20% APS 1%, e seminato in piastre P100 con densità cellulare 10mL di tessuto/piastra.

I preadipociti umani di grasso sottocutaneo comperati dalla ditta Lonza sono stati trattato secondo le indicazioni della ditta fornitrice. In breve, le cellule, di coltura primaria, sono state scongelate e centrifugate a 300g, e seminate alla densità di 9000cellule/cm², nel terreno indicato dalla ditta (cod. PT9502).

2.2.2. Differenziamento adipogenico, osteogenico e miogenico

I campioni cellulari, destinati agli studi di differenziamento, sono stati seminati su vetrini, idonei all'adesione delle cellule (Sacco); i vetrini sono stati sterilizzati prima

di essere inseriti in piastre per coltura cellulare. Le cellule sono state mantenute in coltura di proliferazione per il tempo necessario al raggiungimento della densità cellulare adeguata, 2-4giorni, prima del differenziamento. Il differenziamento adipogenico è stato indotto coltivando le cellule isolate da tessuto adiposo per quattro settimane con terreno adipogenico composto di 10%FBS, 1% APS, desametasone 1uM, 3-isobutil-1-metilxantina 0,5mM, insulina 10ug/mL e indometicina 60uM, in DMEM-LG. Il differenziamento è stato osservato con microscopia ottica dopo colorazione con Oil Red O (ORO) ed Ematossilina (Kern, et al. 2006; Mitchell, et al. 2006; Lee, et al. 2004).

Il differenziamento osteogenico è stato indotto coltivando le cellule estratte da tessuto adiposo con terreno differenziativo osteogenico costituito di FBS 10%, APS 1%, desametasone 0,1mM, acido β -glicerofosfato 10uM e acido ascorbico 50 μ g/mL, in α -MEM; per osservare il differenziamento osteogenico è stata valutata l'attività fosfataseica, col metodo citochimico del naftolo fosfato, e la mineralizzazione extracellulare mediante colorazione di von Kossa (Gomillion, et al. 2006; Jaiswal, et al. 2000).

Infine, per il differenziamento miogenico, il protocollo classico prevede l'incubazione delle cellule in 5-Azacidina 10uM (Taylor, et al. 1979); avendo già trattato le colture con tale fattore, i campioni sono stati mantenuti in terreno arricchito con HS 10%, e con *Chick Embryo Extract* (CEE; US Biological) 1%), oltre a FBS 20%. Il trattamento con tale terreno è durato circa 4 settimane, prima che i campioni fossero fissati in metanolo, 8 minuti a 4°C, per i preparati d'immunofluorescenza.

2.3. Saggi di citotossicità

2.3.1. Test con sali di MTT per la vitalità cellulare

Il saggio con bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio (MTT) è un test colorimetrico quantitativo, che fornisce un'indicazione relativa della popolazione vitale; permette di valutare la tossicità di una sostanza, attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare ottenuti dalla popolazione trattata rispetto al controllo. Il saggio si avvale della capacità delle deidrogenasi mitocondriali di ridurre la molecola di MTT di colore giallo per dare un altro composto cromogeno, detto formazano, di colore violetto. Il formazano è insolubile nell'ambiente intracellulare e non è in grado

di attraversare la parete, perciò si accumula nelle cellule in cui i sistemi di trasporto di elettroni, quali le deidrogenasi mitocondriali, sono ancora metabolicamente attivi. Quindi, il trattamento dei campioni con isopropanolo acido permette l'estrazione e la solubilizzazione dei sali di formazano per la lettura spettrofotometrica a 570nm. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e, quindi, all'attività metabolica e vitalità cellulare.

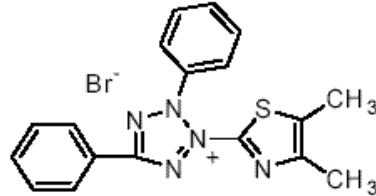


Figura 2.1 Sale di MTT

Per ciascun test con MTT, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, con densità 2000cellule/pozzetto. Il saggio è stato condotto durante e dopo il trattamento con l'agente demetilante. In breve, ad ogni tempo di analisi il terreno di coltura è stato sostituito con terreno serum-free contenente il sale MTT, alla concentrazione finale di 0,5mg/mL; dopo due ore e mezza di incubazione, il terreno con MTT in eccesso è stato allontanato e le cellule lisate, con isopropanolo acido per 15 minuti. Al termine del tempo di estrazione del sale, si è proceduto alla lettura dell'assorbanza, alla lunghezza d'onda 570nm, con lettore ELISA ELX808 della BioTek Instruments.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite test di Student (*t-test*). I dati rappresentati indicano il numero di cellule vitali, ottenuto inserendo le misure di assorbanza nella curva standard. Il grafico è relativo ad un esperimento, ma è rappresentativo dei risultati ottenuti dallo studio di sette diverse popolazioni cellulari.

2.3.4. Saggio con BrDU per la proliferazione cellulare

Per studiare la capacità proliferativa cellulare in seguito al trattamento demetilante è stato utilizzato un saggio colorimetrico quantitativo, che si basa sulla capacità del nucleotide 5-bromo-2'- deossiridina (BrdU kit ELISA, Roche cod. 11647229001) di legarsi al DNA, durante la fase replicativa. Poiché la proliferazione cellulare richiede la replicazione del DNA, il monitoraggio della sintesi di DNA diventa un parametro indiretto di proliferazione cellulare. La BrdU è un analogo

pirimidinico; esso intercala nel DNA durante la fase mitotica al posto della timidina, che nel passato è stata usata, per lo studio dell'attività mitotica, nella forma di isotopo H3-timidina. Dopo l'incorporazione nel DNA delle cellule del campione, la BrdU è stata rilevata mediante due passaggi, di immunoreazione e di colorazione, secondo le istruzioni della ditta produttrice del kit utilizzato per il saggio. Perciò, le cellule sono state incubate per 18ore con BrdU 100 μ M; poi, sono state fissate mediante esposizione per 30 minuti al fissativo alcolico contenuto nel kit. I campioni fissati sono stati incubati per 90 minuti con l'anticorpo anti-BrdU, e, infine, dopo l'eliminazione dell'anticorpo residuo, i campioni sono stati lavati e trattati con la sostanza colorante e dopo 5minuti si è proceduto all'acquisizione dei dati di assorbimento alla lunghezza d'onda di 405nm, con lettore ELISA ELX808 della BioTek Instruments.

Per gli studi di proliferazione su cellule trattate con 5-Azacidina, le popolazioni cellulari sono state seminate con densità di 2000 cellule per pozzetto, di piastra *multiwells* da 96; i saggi di proliferazione sono stati condotti sia durante il periodo di incubazione con l'agente demetilante, 5- Azacidina, che nei giorni successivi al termine del trattamento. Per la valutazione dell'effetto della 5-Azacidina sulla proliferazione si è considerato un unico tempo di incubazione di quattro giorni, e un *range* di concentrazioni (1-10 μ M) di 5-Azacidina.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando la funzione di Office Excel *t-test*. Il grafico illustra i dati di assorbanza relativi ad un esperimento, ma sono rappresentativi dei risultati ottenuti dall'analisi di sette differenti studi di demetilazione, in popolazioni cellulari provenienti sia da soggetto sano, che patologico.

2.3.5. Conta cellulare per l'analisi del PDL

Oltre agli studi di vitalità e proliferazione, è stata valutata la capacità di crescita cellulare. Per l'espansione delle generazioni successive al trattamento con 5-Azacidina, le cellule sono state seminate in piastre di 60mm di diametro, alla densità di 10⁵ cellule per piastra. Le cellule sono state staccate mediante soluzione di Tripsina, e contate in cameretta di Burker, ogni 48 ore (tempo richiesto per la duplicazione delle cellule estratte da tessuto adiposo). La crescita cellulare è stata misurata attraverso una semplice conta cellulare in cameretta di Burker, dopo essere state lavate dal terreno di coltura e trattate con soluzione di Tripsina-EDTA. La sospensione cellulare è stata poi frazionata, e la quota di 10⁵ cellule è stata nuovamente seminata per raccogliere il dato

relativo al successivo passaggio di crescita. Il dato di duplicazione della popolazione, il *Population Doubling Level* (PDL), è stato ricavato dal numero di cellule contate dopo il distacco enzimatico (NH) tenendo conto del numero di cellule seminate (Ni) secondo la seguente formula: $PDL = [\log_{10}(NH) - \log_{10}(NI)] / \log_{10} 2$ (Campagnoli, et al. 2001).

Ad ogni generazione e per ciascuna condizione di coltura sono state staccate tre piastre, e raccolto tre valori di PDL per poter calcolare i dati statistici di deviazione standard e significatività ($P < 0,001$). Il termine dello studio sull'espansione cellulare è stato determinato dall'incapacità di espansione entro le 72 ore, osservato per entrambe le popolazioni, trattata e controllo.

2.4. Analisi citochimiche

2.4.1. Colorazione Oil Red O

Il colorante lipofilo Oil Red O (ORO) è ampiamente utilizzato per caratterizzare le cellule adipose differenziate, perché è in grado di legare i lipidi neutri contenuti nelle vescicole grasse delle cellule mature, evidenziandole in rosso. In questo lavoro la colorazione ORO è stata contrastata con Ematossilina che colora in blu il citoplasma e, più intensamente, il nucleo. I campioni cellulari sono stati fissati con formalina 10% per 1h a TA. Dopo la reidratazione di 15 minuti in acqua di fonte, il campione è stato incubato per 15 minuti con una soluzione formata da 2 parti di acqua distillata e tre di ORO soluzione madre (5mg/mL di ORO, in isopropanolo). Allontanato il colorante in eccesso, il campione è stato lavato con acqua distillata, e incubato con Ematossilina per alcuni minuti a TA; dopo i lavaggi in acqua e una veloce asciugatura in stufa, il campione è stato montato su vetrino copri oggetto con montante acquoso Aquavitrex (Merk Generics).

2.4.2. Colorazione della fosfatasi alcalina

L'enzima fosfatasi alcalina (ALP) agisce sul substrato naftolo AS-MX, liberando il naftolo, che lega il sale di diazonio Fast Blue BB colorato. Il dato ottenuto è una misura semi-quantitativa dell'attività fosfatasica.

In breve, subito dopo aver fissato per 10 minuti a TA con formalina 10%, il campione cellulare è stato incubato per 20 minuti con la soluzione acquosa contenente substrato Naftolo-AS MX fosfato alla concentrazione di 0,1mg/mL in 0,5% N,N-dimetilformammide e MgCl 2mM, e diluito 200 volte con la soluzione di sale di

diazonio Fast Blue BB alla concentrazione 0,6mg/mL in tampone TRIS/HCl 0,1M pH8,5. Per mantenere la colorazione, il campione è stato disidratato con soluzioni di alcool etilico a gradiente ascendente fino all'alcol assoluto; poi il campione è stato montato su vetrino porta oggetto con Eukitt (Fluka).

2.4.3. Colorazione di von Kossa

La colorazione di von Kossa evidenzia i depositi di calcio e, quindi, lo stato di mineralizzazione della matrice nelle colture cellulari in differenziamento osteogenico. Il metodo consiste nel trattamento con una soluzione di argento nitrato: l'argento sostituisce il calcio in seguito ad una reazione di riduzione prodotta dalla luce UV. Poiché una lampada UV da laboratorio (60-100watt) fornisce una luce molto debole, la reazione da una colorazione marrone scuro-nera anziché metallica (http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/von_kossa.htm).

Dopo averli fissato in formalina al 10%, i campioni sono stati trattati con la soluzione Argento Nitrato 1% ed esposte alla luce UV per 45 minuti-1 ora. Dopo diversi lavaggi con acqua distillata, i campioni sono stati trattati con una soluzione di Sodio Tiosolfato 5% per 5minuti. Infine è stata eseguita la colorazione di contrasto con una soluzione acquosa di Nuclear Fast Red (NFR), composta da Alluminio Solfato 5% e NFR 1%.

Per visualizzare i campioni di citochimica è stato utilizzato il microscopio a contrasto di fase Leica DMR, dotato di telecamera DC500 per l'acquisizione digitale di immagini. Gli obiettivi utilizzati Per l'osservazione microscopica sono stati utilizzati gli obiettivi a secco acquisite con obiettivo HCX NPlan 20X/NA0,40 e HCX PL Fluotar 40X/NA0,75.

2.5. Analisi del glicerolo extracellulare

Per la valutazione dell'attività metabolica della lipoproteina lipasi (LPL), è stata misurata la concentrazione di glicerolo libero nell'ambiente extracellulare. La LPL catalizza l'idrolisi del legame tra gli acidi grassi e il glicerolo (Ailhaud G, 1992).

Le cellule trattate e non-trattate con l'agente demetilante sono state differenziate in senso adipogenico. Nei tempi di coltura, che comprendo il termine del trattamento demetilante, il periodo di recupero e il differenziamento adipogenico, sono stati raccolti campioni di terreno per l'analisi della concentrazione di glicerolo extracellulare. Il

campione raccolto al termine del trattamento demetilante corrisponde a quattro giorni di coltura, mentre tutti gli altri campioni sono stati raccolti a tre giorni dall'ultimo cambio di terreno, proliferativo o differenziativo. Per l'analisi del glicerolo extracellulare, 100 μ L di campione è stato trattato per 10 minuti a temperatura ambiente, con la mix di reagenti *Free Glycerol Reagent*, che contiene una glicerolo-chinasi ed una glicerolo-ossidasi. Mentre il primo enzima fosforila il glicerolo presente nel campione, l'ossidasi ossida il glicerolo ad acetone fosfato, liberando ossigeno radicale (perossido di idrogeno), che reagisce col substrato formando un colorante, con caratteristica di massimo assorbimento a 540nm. L'aumento di assorbanza alla lunghezza d'onda di 540nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di glicerolo nel campione; perciò prima della lettura dei campioni è stata realizzata una curva di taratura con glicerolo standard. Per ogni condizione di trattamento sono stati raccolti n 3 campioni, letti allo spettrofotometro (Beckman DU 530) n 3 volte, per ottenere un dato statistico, con CV percentuale sempre inferiore al 3%. Per la determinazione della significatività statistica è stata utilizzata la funzione t-test di Office Excel.

I risultati illustrati nel grafico sono relativi ad uno dei due campioni di tessuto utilizzati per questa indagine; i risultati ottenuti con l'altro campione sono comparabili a quelli mostrati.

2.6. Microscopia

2.6.1. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Nella microscopia elettronica si utilizza un fascio di elettroni, anziché di luce visibile; perciò, il potere di risoluzione del microscopio elettronico è circa 1000 volte superiore a quello del microscopio ottico e permette di distinguere due punti distanti tra loro 0.5 nm.

La risoluzione di un microscopio aumenta al diminuire della lunghezza d'onda della luce utilizzata per l'osservazione; ciò limita la risoluzione dei microscopi ottici, anche nelle condizioni migliori, a 0,2 micron. Utilizzando un fascio di elettroni in un sistema ad alto vuoto, focalizzato e controllato mediante lenti elettromagnetiche è possibile portare la risoluzione a dimensioni molecolari: gli elettroni con lunghezza

d'onda di 0,4 nm permettono ingrandimenti superiori ai 10000x, con potere risolutivo di 0,5 nm.

Nel SEM gli elettroni che formano l'immagine finale vengono riflessi dal campione o sono elettroni secondari, emessi dal campione dopo essere stato colpito da un fascio elettronico primario. Il SEM è utilizzato per esaminare dettagliatamente le superfici esterne di campioni come virus, piccole componenti di animali o cellule intere. Per questa sua funzione, i campioni sono preparati in modo da mantenere l'integrità delle superfici esterne.

Normalmente i campioni biologici devono essere disidratati, e tutti i campioni non metallici devono essere ricoperti di una patina di oro palladio. L'allestimento dei preparati biologici per l'osservazione al SEM è necessaria per rendere il campione biologico stabile sotto il fascio elettronico. Un campione biologico è costituito per il 70-80% di acqua; se viene posto nel SEM, senza preparazione, l'acqua evaporerà istantaneamente a causa del vuoto spinto, con conseguente contrazione del campione. Perciò è stato necessario sottoporre il campione ad una serie di passaggi preparativi:

1. Fissazione: in glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0,2M pH 7,2.

2. Disidratazione: passaggi di 5-10min h in alcol etilico a concentrazione crescente (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%), e, infine, in alcool 100%, prima dell'analisi al SEM.

3. *Critical Point Drying* (CPD): è la completa sostituzione dell'alcol etilico con la CO₂ gassosa;

permette l'evaporazione della soluzione disidratante la cui tensione superficiale influenzerebbe la morfologia della superficie del campione.

4. Metallizzazione: il campione è stato ricoperto con uno strato sottile di un metallo (oro) per rendere conduttivo il campione ed aumentare il contrasto topografico (fornendo elettroni secondari); il metallo, inoltre, stabilizza strutture delicate contro il riscaldamento prodotto dal fascio elettronico.

2.6.2. Epifluorescenza

E' stato utilizzato il microscopio a fluorescenza Leica DM2500, con sorgente luminosa, a vapori di mercurio, che eccita il preparato dall'alto (sistema ad epifluorescenza). La lampada utilizzata è caratterizzata da elevate efficienza di

eccitazione a determinati range di lunghezze d'onda, nella regione bassa del visibile e nel vicino ultravioletto. La luce emessa passa il filtro di eccitazione che seleziona un *range* ristretto di lunghezze d'onda, creando così un fascio di fotoni; questo fascio è riflesso dal filtro dicroco, e focalizzato dalle lenti convergenti sul campione, dove eccita il fluoroforo, sensibile alle lunghezze d'onda incidenti.

I filtri di eccitazione utilizzati nello studio:

- Filtro A, con *range* di eccitazione UV, per la visualizzazione del fluoroforo DAPI (ex max 360nm/em max 460nm);
- Filtro I3, con *range* di eccitazione nel blu, per la visualizzazione dei fluorofori Fluoresceina (ex max 488; em 520-530), ed Alexa-fluor 488 (em 530);
- Filtro M2, con range di eccitazione nel verde, per la visualizzazione del fluoroforo Alexa-fluor 594 (em 630).

Le immagini illustrate sono state acquisite con obiettivo HCX NPlan 20X/NA0,40 e HCX PL Fluotar 40X/NA0,75 (a secco), e camera digitale Leica DC500.

2.6.3. Microscopia confocale a scansione laser

Un'evoluzione della microscopia in fluorescenza è il *Laser Scanning Confocal Microscopy* (LSCM), in cui la radiazione incidente è prodotta da un laser ed è caratterizzata da una lunghezza d'onda definita. Il fascio di luce coerente e collimato percorre il canale spettrale, passa attraverso un pinhole e viene focalizzato su un singolo punto del campione. La fluorescenza emessa da questo punto è focalizzata su un secondo pinhole e raccolta con un fotomoltiplicatore. Mano a mano che il fotone di emissione si avvicina al detettore, oltre il pinhole di uscita, esso è accompagnato in maniera confocalizzata da specchi galvanometrici. Un sistema di scansione costituito da sensori interlinea è impiegato per acquisire punti diversi del campione allo scopo di comporre l'immagine finale.

Poichè la radiazione emessa da un singolo punto del campione non è confusa con quella proveniente dalle regioni fuori fuoco, l'immagine ottenuta ha un grado di definizione molto elevato. Inoltre, ogni immagine bidimensionale rappresenta una sezione orizzontale, di minimo spessore, del campione, ed è possibile acquisire sezioni seriali che, prese tutte insieme, rappresentano il campione come volume piuttosto che come singola immagine bidimensionale. L'analisi tridimensionale degli oggetti in

esame ha rappresentato una profonda rivoluzione nel cammino evolutivo della microscopia ottica in fluorescenza.

Lo strumento utilizzato per questo studio è un Leica TSC SP5: microscopio confocale, dotato di laser Argon (multilinea, 456-476-488-514) e He/Ne (I-543 e II-633), per la scansione confocale, e di una lampada al mercurio, per la fluorescenza osservata all'oculare. Si tratta di un microscopio rovesciato, equipaggiato con obiettivi HCX PL Fluotar 20X/NA0,50 (a secco) e HCX PL Apo 63X/NA1,40 (per immersione in olio). Al microscopio è associato il Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) con cui sono state rielaborate le immagini ottenute dalla somma di 4 scansioni alla risoluzione 512x512 pixels.

2.6.4. Preparazione dei campioni per l'analisi con immunofluorescenza

La marcatura degli antigeni mediante immunofluorescenza è stata effettuata su campioni fissati in paraformaldeide (PFA) 4%, per 10 minuti a TA. A seconda della localizzazione della proteina di interesse, il campione è stato permeabilizzato con Triton X-100 1% in PBS, per 10 minuti TA. I siti aspecifici sono stati neutralizzati con *Horse Serum* (HS) 10% in PBS, per minimo 1 ora. Gli anticorpi primari sono stati diluiti, secondo le indicazioni della casa produttrice, con una soluzione HS 3% in PBS. Gli anticorpi (Ac) primari prodotti da Santa Cruz, sono: **CD14** (TUK-4) sc19588, **CD31** (10G9) sc13537, **CD34** (H140) sc9095, **CD105** (P3D1) sc18838, **ADRP** (N20) sc32448, **SREBP** (H160) sc8984, **GLUT4** (N20) sc1606, **Ob** (H146) sc9014, **ObR** (H300) sc8325, **Perilipina** (C14) sc47319, **NANOG** (N17) sc30331, **OCT4** (C10) sc5278, **Vimentina** (C20) sc7557, **Collagen I** (C18) sc8784. L'anticorpo contro l'alfa-ACTINA umana è stato acquistato da Sigma (A2547); mentre l'Ac STRO1 è R&D Systems (MAB1038).

Per la marcatura del campione cellulare si è scelto il tempo di incubazione *overnight* (ON) a +4°C. Per rimuovere ogni traccia di Ac, prima del passaggio successivo, sono stati eseguiti lavaggi di 10 minuti con HS 3% in PBS. L'Ac secondario, biotinilato o coniugato, è stato diluito in HS 1,5% in PBS. Nel caso della marcatura con Fluoresceina, è stata utilizzato un anticorpo secondario biotinilato *Pan Specific* (Vector, BA 1300) e la streptavidina coniugata alla Fluoresceina (Vector, A2001). Per la marcatura diretta dell'anticorpo primario sono stati utilizzati gli anticorpi secondari

coniugati Alexa-fluor-594 (A11058, A11032 e A11012) e Alexa-fluor-488 (A11029 e A11034).

Per la visualizzazione dei campioni alla microscopia confocale, il nucleo è stato colorato con Sytox Green (Invitrogen) 0,5 μ M in TRIS pH7,5, e i vetrini sono stati montati con una soluzione Glicerolo:PBS, 1:1. Per l'epifluorescenza è stato utilizzato il montante con DAPI della ditta Vector.

2.7. Citofluorimetria

Per l'analisi citometrica è stato utilizzato il citofluorimetro *MoFlo High Speed cell sorter* della Dako Cytomation. Lo strumento, che può essere equipaggiato con tre laser, al momento dell'analisi montava un unico laser Argon (utilizzato a 80mW), con ampia possibilità di lunghezze d'onda di eccitazione. I campioni sono stati marcati con diversi fluorofori: FITC (Florescina isotiocianato, em 530nm), RPE (R-Ficoeritrina, 580nm), PE-Cy5 (Ficoeritrina e Cianina5, em 670nm) ed analizzati mediante il rispettivo canale di detezione (FL1, FL2, FL4) che capta i segnali luminosi della fluorescenza, li converte in segnali elettrici e li amplifica, per la visualizzazione grafica.

Le analisi sono state condotte alla velocità media di 50-100 eventi al secondo con pressione di flusso del campione 0,1-0,3psi superiore al liquido di trasporto (*sheat fluid*), per un totale di 50000 eventi, analizzati per ogni campione.

La preparazione del campione per l'analisi ha previsto il distacco dei campioni cellulari dalla piastra mediante soluzione di Tripsina(0,25%)-EDTA(0,02%), per ottenere una sospensione di cellule singolarmente suddivise. Per la neutralizzazione dei siti aspecifici, prima della marcatura diretta, il campione cellulare è stato risospeso in una soluzione al 2% di Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS. Dopo la neutralizzazione, i campioni cellulari sono stati risospesi e suddivisi in 200000cell/100uL di BSA2% in PBS, in tanti tubi da centrifuga quante le condizioni di analisi (anticorpi contro marcatori di interesse + controllo isotipico); quindi vi è stato aggiunto l'anticorpo nel quantitativo di 10uL. I marcatori utilizzati sono stati acquistati dalla ditta Santa Cruz: CD29-FITC, CD90-FITC, CD105-RPE, CD34-PECy5, CD44-RPE, CD31-RPE, CD14-PE, HLA-DR-RPE, CD71-RPE, CD117-RPE, CD38-FITC, CD45-RPE (leucocitari).

Prima dell'analisi, i campioni cellulari sono stati meccanicamente risospesi per garantire l'efficacia dell'analisi, dato che lo strumento analizza ogni cellula singolarmente (evento).

Per l'analisi e realizzazione degli istogrammi è stato utilizzato il programma Summit; il dato positivo è stato calcolato con la Overton Subtraction.

2.8. Western Blotting (WB)

Per rivelare la presenza dei marcatori SREBP ed ADRP propri della cellula derivata da tessuto adiposo e verificare i dati ottenuti per mezzo di marcatura e rivelazione con microscopia a fluorescenza, è stata condotta una indagine mediante Western Blotting.

2.8.1. Preparazione del campione

Si è proceduto alla preparazione dell'estratto proteico dei campioni cellulari con un soluzione contenente tensioattivi, quali Triton X-100 e sodio-deossicolato, in grado di lisare le cellule e solubilizzare le proteine cellulari; i campioni di lisato sono stati centrifugati a 14000g per 10minuti a TA, prima di essere aliquotati per la crioconservazione a -80°C. Un'aliquota per ciascun campione di lisato cellulare è stata utilizzata per la quantificazione proteica mediante analisi quantitativa spettrofotometrica, con BCATM Protein Assay Kit (Pierce).

2.8.2. Quantificazione proteica.

Il kit sfrutta, nella prima fase di reazione il metodo del biureto, che si basa sull'uso di sali di rame per misurare il contenuto proteico; quindi, aggiungendo Cu⁺⁺ (CuSO₄) alla soluzione da quantificare, in ambiente alcalino per sodio potassio tartrato, si formano dei chelati del rame Cu⁺ con residui amminoacidici, che danno colorazione viola. Poiché il saggio del biureto misura nel range 5 mg/ml to 160 mg/ml, il kit presenta un seconda fase dell'analisi, con la reazione colorimetrica del rame, che nello stato di ossidazione +1, chela due molecole di acido bicinchinonico (BCA) dando una colorazione che è stata quantificata alla lunghezza d'onda 570nm, con lettore ELISA ELX808 della BioTek Instruments. Per l'analisi quantitativa, è stata costruita la retta di taratura con BSA e per ogni campione sono stati raccolti due valori.

2.8.3. SDS-PAGE (Elettroforesi in gel di poliacrilammide)

L'elettroforesi permette di separare molecole cariche, sulla base della diversa mobilità in un determinato campo elettrico. Le proteine sono state denaturate con con sodio-dodecil-solfato (SDS), un detergente anionico che si lega con grande affinità alle proteine (una molecola di SDS ogni due aa circa), e con beta-mercaptoetanololo necessario alla riduzione dei legami disolfuro. Per risolvere le proteine denaturate con SDS e beta-mercaptoetanololo è stata operata una migrazione, indotta da un campo elettrico, in gel di poliacrilammide. Il gel di poliacrilammide si è dimostrato molto efficiente nella separazione delle molecole proteiche, grazie all'effetto setaccio, che separa le micelle proteiche di diversa dimensione, ed alla grande omogeneità dei pori che si creano durante la reazione di polimerizzazione di acrilammide/bis-acrilammide in presenza dei reattivi ammonio-persolfato (APS) e tetrametiletilendiammina (TEMED).

Per la corsa elettroforetica delle proteine estratte dai campioni delle colture cellulari in esame, è stato costruito un gel, composto da un gel di corsa (*running gel*) al 10%, e da un gel di precorsa (*stacking gel*) al 4%. E' stata utilizzata la cella verticale Elettrofor, modello VP-160, alimentata con alimentatore, modello Elettrofor, EFD400. La percentuale di poliacrilammide del 10% nel gel è stata utilizzata perché adatta alla risoluzione di entrambe le proteine ricercate: SREBP1 125kD e ADRP 48kD. Per la corsa elettroforetica sono stati caricati 20ug di proteina, in un volume di 15uL. Ogni campione (volume di 12 uL in Triton X-100, 10%; sodio desossicolato, 5%; sodio cloruro 1,5M; TRIS 1mM, pH 7,6; cocktail di inibitore di proteasi 10%) è stato denaturato con 3uL di soluzione campioni costituita da: TRIS 250mM, pH6.8; SDS 10%; blu di bromofenolo 0,01%; glicerolo 50% e b-mercaptoetanololo 25%. Prima di essere caricati i campioni sono stati mantenuti in blocco termostato a 95°C per 10 minuti. La corsa elettroforetica è stata condotta a voltaggio costante di 60 mV in buffer di corsa costituito da: TRIS 1mM, pH8,3; glicina 960mM; SDS 0,1%; acqua).

I reattivi utilizzati sono prodotti per elettroforesi Sigma come anche il cocktail di inibitori di proteasi (codice PT2714-1BTL).

2.8.4. Blotting

Dopo aver frazionato le proteine nel gel, queste sono state trasferite su una membrana, mediante elettroblotting utilizzando una cella Elettrofor TB3000.

Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato rimosso dalla cella e posto per 15 minuti nel tampone per blotting. Successivamente è stato costituito il *sandwich* per il blotting unendo nell'ordine: spugna, foglietto di carta Whatman n. 1 imbevuta di tampone, gel, membrana equilibrata per 10 minuti nel tampone, secondo foglietto di carta Whatman e spugna. Il trasferimento elettroforetico è stato condotto con una corrente costante di 400 mA per 3 ore e mezza.

2.8.5. Rilevazione delle proteine

Per l'analisi delle proteine SREBP ed ADRP, è stato utilizzato materiale GE Lifescience: membrana in nitrocellulosa Hybond™ ECL (RPN 303D); anticorpo secondario a-rabbit coniugato HRP (*Horseradish Peroxidase*) (NA-931); reagenti di detezione ECL (RPN 2106); Hyperfilm ECL (28-9068-36). Infine, è stato utilizzato l'anticorpo a-goat coniugato-HRP della ditta Calbiochem, per la rilevazione di ADRP.

Per la rilevazione delle proteine, come per l'immunofluorescenza, è stato necessario disattivare i siti aspecifici, mantenendo la membrana in una soluzione al 10% (p/p) di latte in polvere, totalmente scremato (Sigma), per una notte (*overnight*, ON) a 4°C. La membrana è stata quindi incubata per 1 ora, mantenendola in agitazione a TA, in una soluzione contenente l'anticorpo primario diluito 500 volte con tampone TBS-T (come indicato nel manuale Amersham ECL *Western blotting detection reagents and analysis system*). Dopo abbondanti lavaggi in TBS-T la membrana è stata nuovamente incubata nel rispettivo anticorpo secondario per 1 ora e mezza in agitazione a TA. Infine, la membrana è stata trattata con i reagenti di detezione (GE Lifescience, RPN 2106) per 1 minuto e subito inserita nella cassetta per lo sviluppo. La pellicola fotografica è stata sviluppata utilizzando il liquidi di sviluppo e fissaggio della Kodak.

2.8.6. Analisi dei risultati

Per l'analisi delle bande ottenute è stato utilizzato l'indicatore di peso molecolare ECL DualVue Western Blotting Markers, della GE Lifescience (cod. RPN810): il kit contiene 7 proteine ricombinanti dal peso noto di 15, 25, 35, 50, 75, 100 and 150 kDa. Le proteine sono rilevate mediante la proteina-S coniugata con HRP e i reagenti di detezione ECL utilizzati per i campioni. Le immagini sono state acquisite con Gel Doc 2000, e rielaborate con software Quantity One di Bio Rad.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per facilitare la visualizzazione della parte relativa ai risultati, il capitolo è stato suddiviso nella seguenti sezioni: A. valutazione degli aspetti morfologici e metabolici; B. analisi degli aspetti molecolari. Nella sezione A. sono raccolte le osservazioni morfologiche, i dati di attività metabolica e di proliferazione delle cellule isolate da tessuto adiposo trattate con agente demetilante. La sezione B. presenta i risultati delle analisi sull'espressione di specifici marcatori in cellule estratte da tessuto adiposo dopo il trattamento demetilante.

A. Valutazione degli aspetti morfologici e metabolici in cellule estratte da tessuto adiposo dopo trattamento demetilante

3.1. Coltura e caratterizzazione di cellule estratte da tessuto adiposo umano

3.1.1. Isolamento di cellule-precursore dell'adipocita

Lo studio ha richiesto l'isolamento di cellule da tessuto adiposo umano; sono stati utilizzati 7 campioni di tessuto adiposo ottenuti da paziente obeso e 7 campioni da soggetto sano. In entrambi i casi, l'età del donatore era compresi tra i 25 e i 55 anni; non è stata fatta preferenza di sesso. Durante l'attività di ricerca, tra le due tipologie di campione non sono state osservate differenze nella velocità di espansione, nelle caratteristiche immunofenotipiche, e nella capacità differenziative.

Le cellule, isolate per digestione enzimatica, hanno aderito alla piastra nelle 24ore successive alla semina. Alla microscopia ottica le cellule appaiono piccole e rotondeggianti (Figura 3.1/A); alcune cellule adese presentano nella zona perinucleare del citoplasma, granelli di materiale trasparente come il contenuto lipidico delle vescicole citoplasmatiche dell'adipocita maturo (B); si noti, infatti, che le cellule adipose mature sono capaci di aderire alla plastica, ma galleggiano nel terreno di coltura, perché ricche di materiale poco denso (Matsumoto, et al. 2008).

In altre cellule, invece, si osservano più marcati i prolungamenti e il nucleare. Le colture primarie di cellule ottenute da tessuto adiposo sono caratterizzate dalla presenza di residui di grasso, che, osservati alla microscopia ottica, appaiono molto luminosi, di

forma rotondeggiante e, se molto consistenti, di colore giallo (B). Sono sufficienti 48-72 ore di coltura, affinché le cellule cambino il loro fenotipo (C), allungandosi e modificando la distribuzione corpuscoli citoplasmatici, diventando sempre più simili alle cellule di linea di fibroblasti sensibili ai fattori adipogenici, 3T3L1 (D).

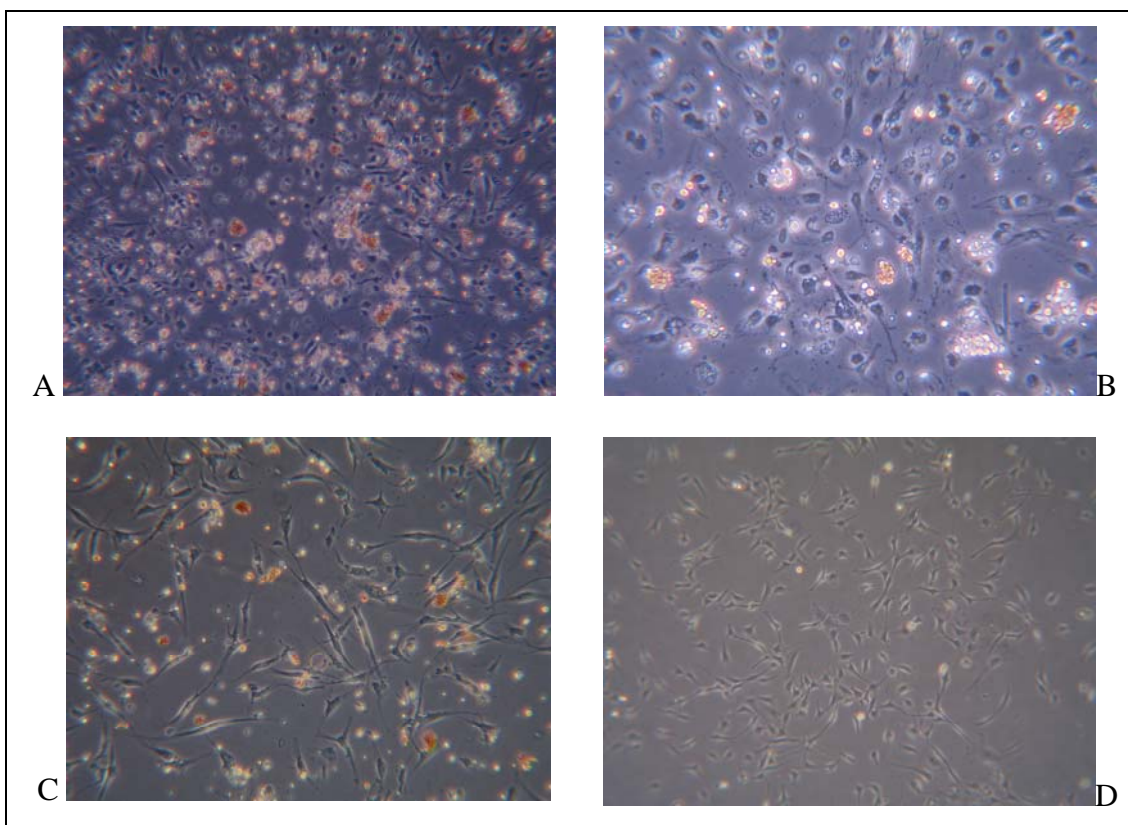


Figura 3.1 Cellule estratte da tessuto adiposo umano in coltura su plastica. Le foto di microscopia ottica mostrano i cambiamenti morfologici nelle cellule isolate da tessuto adiposo umano dopo le prime 24 ore di coltura (A, B) rispetto a un tempo successivo di 72 ore (C), e in confronto con le cellule di linea 3T3L1 (D). Si nota che le cellule estratte da tessuto adiposo umano acquistano una morfologia fibroblastoide del tutto simile alle cellule stabilizzate 3T3L1, con corpo cellulare ben contrastato e prolungamenti caratteristici del fibroblasto. Ad un ingrandimento maggiore sono visibili, nel citoplasma di alcune cellule adese, i vacuoli lipidici tipici della cellula adiposa (B). (Foto di microscopia ottica a contrasto di fase. Ingrandimento 100X: A, C e D; 200x: B.)

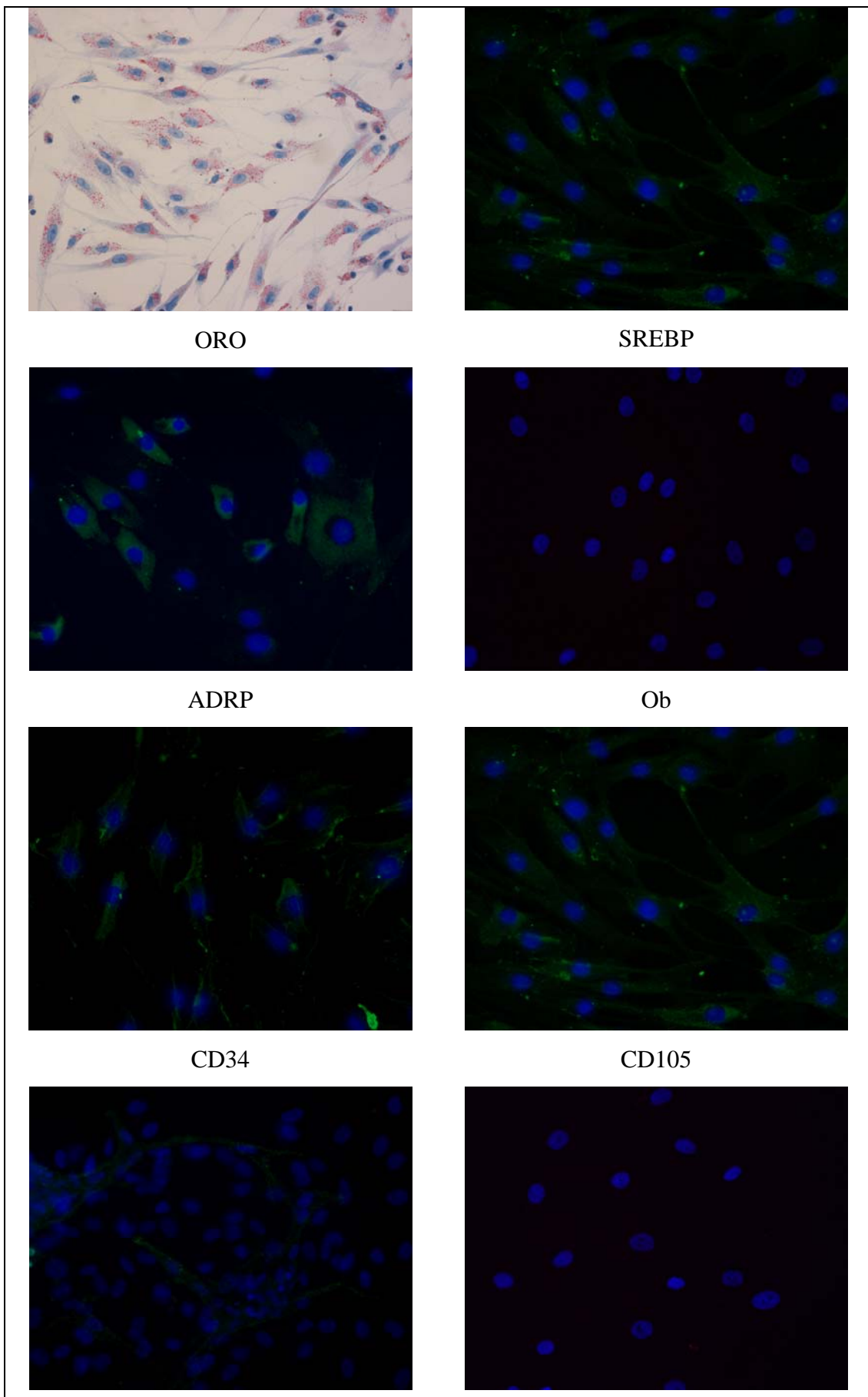
3.1.2. Caratterizzazione delle cellule estratte da tessuto adiposo

La componente cellulare del tessuto adiposo in grado di aderire alla piastra è costituita da cellule precursori dell'adipocita, nei diversi gradi di differenziamento, da cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo, e da cellule endoteliali (Mitchell, et al. 2006; Lee, et al. 2004). Prima del loro utilizzo nello studio sull'effetto dell'agente demetilante 5-Azacidina, le cellule sono state caratterizzate, mediante immunofluorescenza (14 campioni) (Figura 3.2).

Sono stati analizzati i marcatori citoplasmatici tessuto-specifici, quali ADRP e SREBP e i marcatori tardivi Glut4 e leptina, associati alla colorazione Oil red O, per valutare lo stadio di differenziamento e il *commitment* delle cellule presenti nella popolazione prima dell'inizio dell'esperimento di demetilazione.

Le analisi sono state effettuate anche per specifici antigeni di staminalità quali CD34 e CD105; e per antigeni espressi su cellule endoteliali come il CD31. Infine, per escludere la possibilità di una contaminazione con cellule di tipo ematopoietico, è stata testata la positività al marcatore CD14, espresso dai macrofagi e dai granulociti.

Le cellule presentano positività ai marcatori tessuto-specifici di *commitment* e della fase iniziale di differenziamento (SREBP e ADRP); questi risultati si associano alla colorazione ORO che mette in evidenza i molteplici vacuoli presenti nel citoplasma. In modo variabile, tutti i campioni analizzati esprimono anche gli antigeni di staminalità, CD34 e CD105, mentre l'antigene endoteliale CD31, è blandamente presente o assente. I marcatori tardivi di differenziamento adipogenico Glut4 (trasportatore del glucosio, di tipo 4; dato non mostrato) e Ob, non sono espressi, e nemmeno l'antigene macrofagico CD14; infatti, la componente ematopoietica e quella adiposa differenziata, presenti nella sospensione cellulare ottenuta per digestione del tessuto adiposo, sono state perse per le sfavorevoli condizioni di coltura. Infine, sono stati analizzati gli antigeni citoscheletrici; la vimentina, proteina citoscheletrica espressa in cellule endoteliali e fibroblasti, e la α -Actina, specifica della cellula muscolare liscia presente nel tessuto connettivo adiposo, sono entrambe positive all'analisi d'immunofluorescenza.



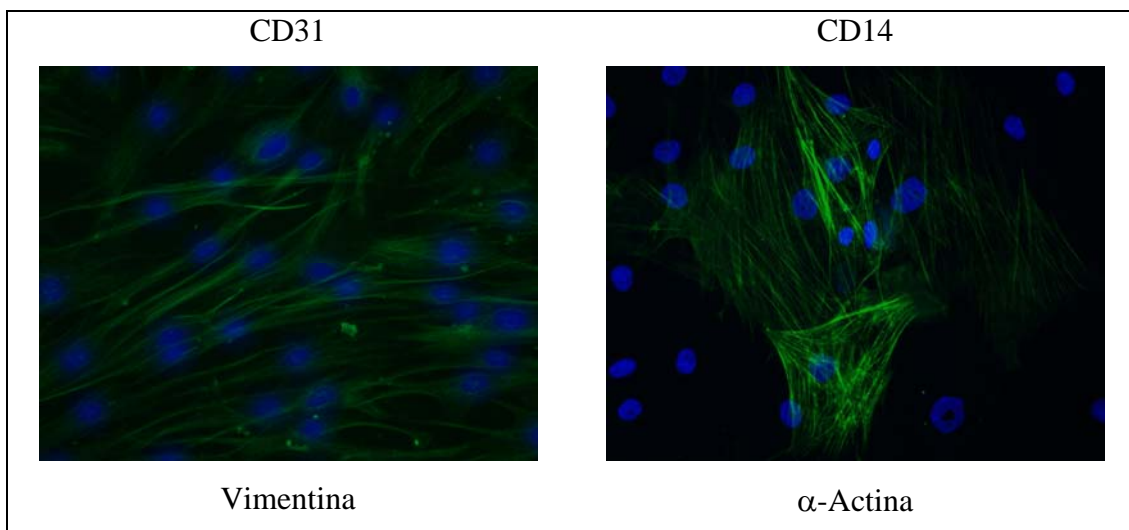


Figura 3.2 Caratterizzazione mediante immunofluorescenza di cellule estratte da tessuto adiposo umano, di soggetto sano, ed espanse fino alla prima generazione. Risultano positivi alla marcatura gli antigeni ADRP, SREBP, CD105 e CD34; è variabilmente espresso il CD31. La popolazione contiene cellule con caratteristiche di staminalità mesenchimale (CD105+, CD34+ CD31-) e cellule precursori dell'adipocita (ADRP, SREBP). La ricerca dell'espressione dell'antigene ematopoietico CD14, e della Leptina (Ob) espressa nell'adipocita maturo, ha dato risultati negativi. Infine, la positività agli antigeni citoscheletrici Vimentina ed α -Actina confermano la provenienza delle cellule, dal tessuto connettivo di origine mesenchimale. (Immagini di epifluorescenza con microscopio manuale Leica DMR, con obiettivo 40x; immagini di Oil Red O mediante microscopia in campo chiaro, con obiettivo 20x).

3.2. Schema sperimentale dello studio dell'effetto del trattamento demetilante, sulle cellule estratte da tessuto adiposo umano.

Per lo studio dell'effetto della 5-Azacidina sono state utilizzate popolazioni cellulari di generazioni successive alla coltura primaria e fino alla terza generazione, di cellule estratte da tessuto adiposo umano. Durante il trattamento con l'agente demetilante, e in tempi successivi, sono state condotte le analisi per valutare la citotossicità della 5-Azacidina, e gli effetti del trattamento sulla capacità proliferativa e sulla risposta a stimoli differenziativi (Figura 3.3).

Dopo 48ore di coltura in terreno di proliferazione, le cellule sono state trattate con 5-Azacidina in terreno DMEM-LG, arricchito con 10%FBS e in presenza di antibiotici. Il *range* di concentrazioni considerato è stato ricavato dalle esperienze riportate in letteratura, di studi di differenziamento e riprogrammazione con la 5-Azacidina, sui modelli cellulari animali. Nel lavoro di Kumar et al. fibroblasti fetali porcini sono stati trattati, per 4 giorni, con concentrazioni di 5-Azacidina comprese tra 0,5 e 5 μ M (Kumar, et al 2006); negli studi di demetilazione sull'espressione di telomerase-retrotrascrittasi (TERT) umana su cellule di linea di fibroblasti immortali

hTERT-, la concentrazione di 5-Azacidina utilizzata è 3uM, per un periodo di incubazione di 4 giorni (Devereux, et al. 1999). In altri studi la concentrazione utilizzata è 10uM, per un periodo non superiore a 4 giorni (Eilertsen, et al. 2007).

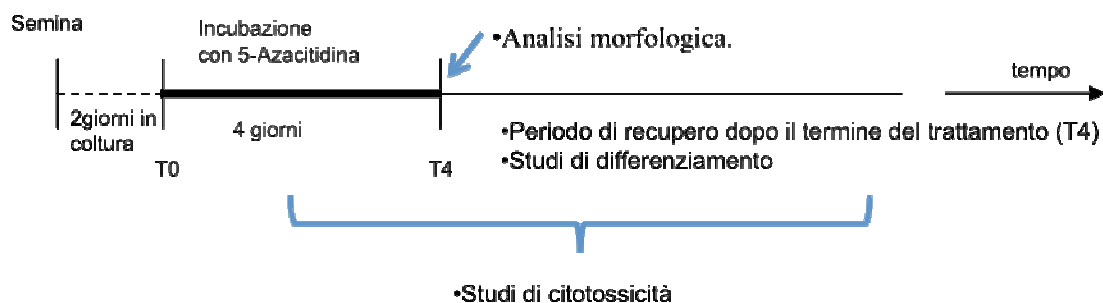


Figura 3.3 Schema sperimentale. A 48 ore dalla semina, le cellule sono state incubate per 4 giorni in terreno contenente DMEM-LG, FBS 10%, APS 1% e 5-Azacidina; nei giorni successivi al trattamento con l'agente demetilante, le popolazioni sono state mantenute in terreno di recupero DMEM-LG, FBS 10%, APS 1%, per gli esperimenti di citotossicità, oppure in terreno differenziativo per gli studi dell'effetto dell'ipometilazione sulla capacità differenziativa delle cellule derivate da tessuto adiposo, e sull'attività metabolica della Lipoproteina Lipase (LPL).

3.3. Citotossicità dell'agente demetilante 5-Azacidina.

3.3.1. Vitalità cellulare.

Per valutare la citotossicità del trattamento demetilante e per evidenziare la concentrazione della sostanza in esame meglio tollerata dalle cellule AT è stato svolto il test semi-quantitativo con sale MTT (Grafico 3.1).

I dati ottenuti sono indici dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali, e quindi, della vitalità della popolazione cellulare. Il test è stato svolto durante il periodo di incubazione con 5-Azacidina, e nel periodo di recupero successivo, fino a dieci giorni dal termine del trattamento con l'agente demetilante. Per lo studio preliminare sull'effetto citotossico dell'agente 5-Azacidina sono stati considerati sette campioni di tessuto adiposo, ottenuti da soggetto sano e patologico. Per lo studio di citotossicità è stato studiato il range di concentrazioni 1-10uM di 5-Azacidina, per un periodo di incubazione di 96 ore. Il grafico illustrato è relativo ad un esperimento, ma è rappresentativo dei dati raccolti con le sette popolazioni cellulari utilizzate.

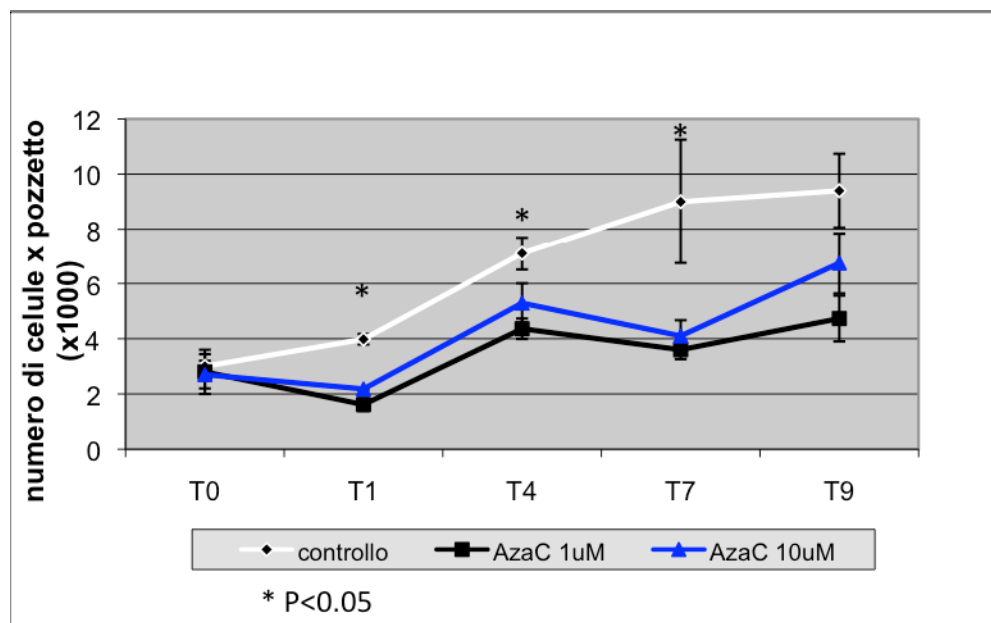


Grafico 3.1 Attività metabolica mitocondriale in cellule derivate da tessuto adiposo, dopo trattamento con 5-Azacidina. Il grafico rappresenta i risultati del test semiquantitativo con MTT e riporta in ascissa il numero di cellule vitali per pozzetto di piastra *multiwell*; nella popolazione trattata rispetto a quella di controllo si osserva una riduzione significativa ($P < 0,05$) della vitalità cellulare, dovuta alla diminuita attività metabolica mitocondriale. Non si osserva significativa differenza di citotossicità tra le due concentrazioni considerate 1uM e 10uM di 5-Azacidina, per il periodo di incubazione di 96 ore. (AzaC=5-Azacidina; analisi statistica: T-Test.)

I risultati raccolti mostrano una riduzione dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali nelle popolazioni trattate con 5-Azacidina rispetto al controllo; in particolare si è osservato un abbattimento iniziale a cui è susseguita una ripresa fino al termine dell'incubazione con 5-Azacidina. Dopo il cambio del terreno si assiste ad un nuovo andamento sinusoidale, con riduzione e ripresa della vitalità cellulare. Per quest'analisi non è stato considerato un tempo successivo ai dieci giorni, a causa del raggiungimento della confluenza massima e del conseguente distacco cellulare.

3.3.2. Capacità proliferative.

La valutazione della capacità proliferativa delle popolazioni trattate con 5-Azacidina è stata ottenuta in maniera indiretta, mediante il saggio con BrdU: un'analogo della timidina, che viene incorporato nel DNA neosintetizzato dalle cellule proliferanti. La valutazione della sintesi di DNA in cellule derivate da tessuto adiposo è stata effettuata durante e successivamente al trattamento con l'agente demetilante. Anche per questo studio, sono stati utilizzati 7 campioni di tessuto adiposo, ottenuto sia da soggetti sani sia patologici; sono state mantenute le condizioni di trattamento, con 5-

Azacitidina 1-10 μ M, e tempo di incubazione di 96 ore (Grafico 3.2). Il grafico, sebbene relativo ad un solo esperimento, è rappresentativo del comportamento osservato in tutte le popolazioni trattate con 5-Azacitidina e testate con il saggio della BrdU.

Nel grafico sono riportati i dati di assorbanza, alla lunghezza d'onda 450nm, relativi alla quantità di DNA reagito con l'agente intercalante BrdU, e quindi alla quantità di DNA replicato. Non sono state registrate significative differenze tra le popolazioni trattate rispetto a quelle di controllo; in entrambi i casi c'è un aumento proliferativo dopo il terzo giorno di trattamento con l'agente demetilante.

Nei tempi successivi al termine del trattamento, l'andamento dell'attività proliferativa è in diminuzione, ma il fatto potrebbe essere imputabile al raggiungimento di una densità cellulare tale da indurre un rallentamento proliferativo per inibizione da contatto.

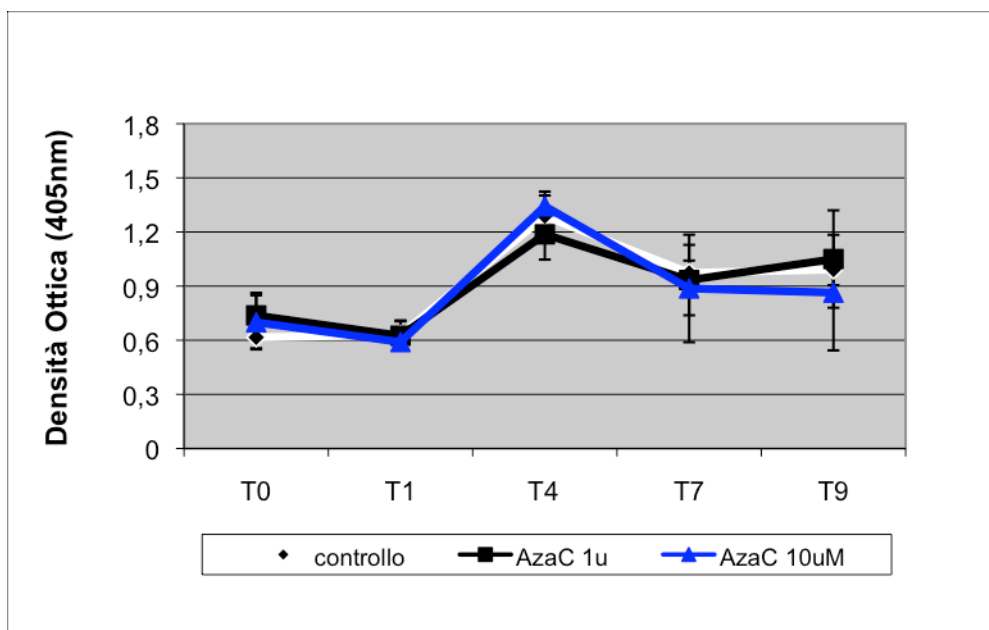


Grafico 3.2 Capacità proliferativa in popolazioni cellulari, derivate da tessuto adiposo, trattate con 5-Azacitidina Il grafico mostra l'attività proliferativa delle popolazioni trattate con l'agente demetilante (linee nera e blu), messa a confronto con la popolazione di controllo (linea bianca). Non si osserva una significativa differenza tra i dati di assorbanza relativi alle popolazioni trattate e quella di controllo: la quantità di BrdU intercalata indica che l'attività replicativa del DNA, nelle popolazioni studiate, è paragonabile. (AzaC = 5-Azacitidina.).

3.3.3. Espansione cellulare.

Infine, è stata studiata la capacità di espansione di cellule trattate con 5-Azacitidina. E' noto che le cellule estratte da tessuto adiposo, essendo cellule differenziate, abbiano un numero di cicli replicativi limitato, diversamente dalle cellule

staminali, che conservano l'attività telomerasica, e quindi sono in grado di replicare senza invecchiare (Kern, et al. 2006; Zuk, et al. 2001). Le cellule umane differenziate hanno una limitata capacità proliferativa nella coltura *in vitro*; la longevità (*lifespan*) delle cellule mature si definisce dal numero di espansioni, o passaggi generazionali, effettuabili prima di osservare nella popolazione cambiamenti morfologici o sofferenza cellulare (Cristofalo, et al. 1998). Lo sdifferenziamento che si osserva nella fase calante dell'espansione *in vitro* e che si riconosce per la perdita del contorno cellulare e per le anomalie a carico del nucleo, è imputato a meccanismi genetici o a fattori ambientali.

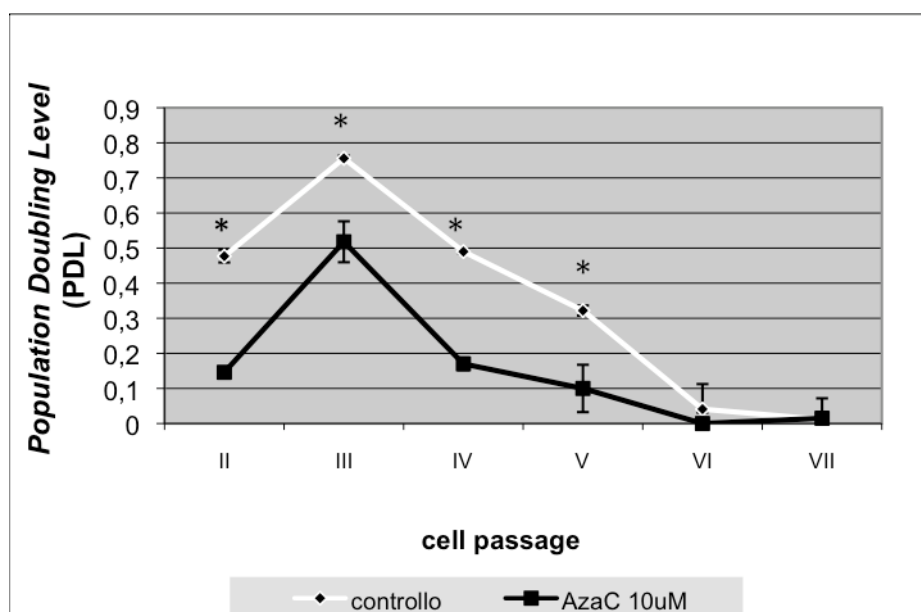


Grafico 3.3 *Population Doubling Level* ($PDL = (\log NH - \log N1) / \log 10$) di popolazioni in espansione generazionale dopo trattamento con 5-Azacidina (linea nera), in confronto alle popolazioni di controllo (linea bianca). Il trattamento con l'agente demetilante ha influenzato in modo significativo la capacità di espansione, infatti la generazione successiva all'esperimento di demetilazione (generazione II) mostra una consistente diminuzione del numero di cellule presenti nella piastra. (* $P < 0,001$)

La valutazione della capacità di espansione è stata effettuata con il calcolo della duplicazione cellulare, conosciuta come *Population Doubling Level* (PDL) (Grafico 3.3). Ogni generazione successiva delle popolazioni controllo e trattato, provenienti dall'esperimento di trattamento con 5-Azacidina 10uM per 4 giorni, è stata staccata mediante soluzione di Tripsina-EDTA, e contata con camera di Burker. La curva di crescita è stata costruita valutando la differenza tra il numero di cellule seminate e il numero di cellule staccate, in merito alla stessa generazione, secondo l'equazione: $PDL = (\log NH - \log N1) / \log 10$, dove NH sta per il numero di cellule staccate e contate e N1 per il numero di cellule seminate.



Figura 3.4 Foto di microscopia ottica di cellule in espansione, dopo trattamento con l'agente demetilante, 5-Azacidina. Cellule estratte da tessuto adiposo, espanse dopo il trattamento demetilante, mostrano le fasi dello sdifferenziamento, con aumento delle dimensioni cellulari, come si vede nel passaggio dalla II alla IV generazione; le cellule di IV generazione mostrano già perdita dello spessore cellulare che diventa notevole nella foto relativa alla VI generazione. Il fatto determinante che decreta lo sdifferenziamento di una popolazione isolata da tessuto umano è la ridotta capacità proliferativa, come discusso nel capitolo del PDL.

Ogni valore di PDL ottenuto per la popolazione trattata con 5-Azacidina è stato confrontato con il dato registrato per il controllo. Nel grafico, la curva di espansione relativa al controllo ha una capacità di crescita significativamente superiore alla popolazione trattata con 5-Azacidina; questa superiorità è mantenuta fino alla VI generazione, quando si registra un fisiologico azzeramento della crescita, accompagnato da sdifferenziamento cellulare (Figura 3.4), come riportato in letteratura (Kern, et al. 2006).

In conclusione, lo studio dell'effetto citotossico dell'agente demetilante sulle cellule estratte da tessuto adiposo di I-III generazione mostra che il trattamento con 5-Azacidina 1-10uM riduce la popolazione vitale rispetto al controllo (Figura 3.1), ma non ha effetto sulla capacità replicativa cellulare, e quindi le cellule trattate con 5-Azacidina risultano proliferative in modo comparabile alla popolazione di controllo non trattata (Figura 3.2).

Si è inoltre valutato l'effetto della demetilazione sulla capacità di crescita cellulare; le cellule di prima generazione sono state incubate con 5-Azacidina 10uM per 4giorni, e poi sono state espanse per 5 generazioni fino ad un evidente stato di sdifferenziamento. Dalle curve di crescita illustrate (Figura 3.3), si deduce che le popolazioni trattate hanno risentito negativamente della presenza dell'agente

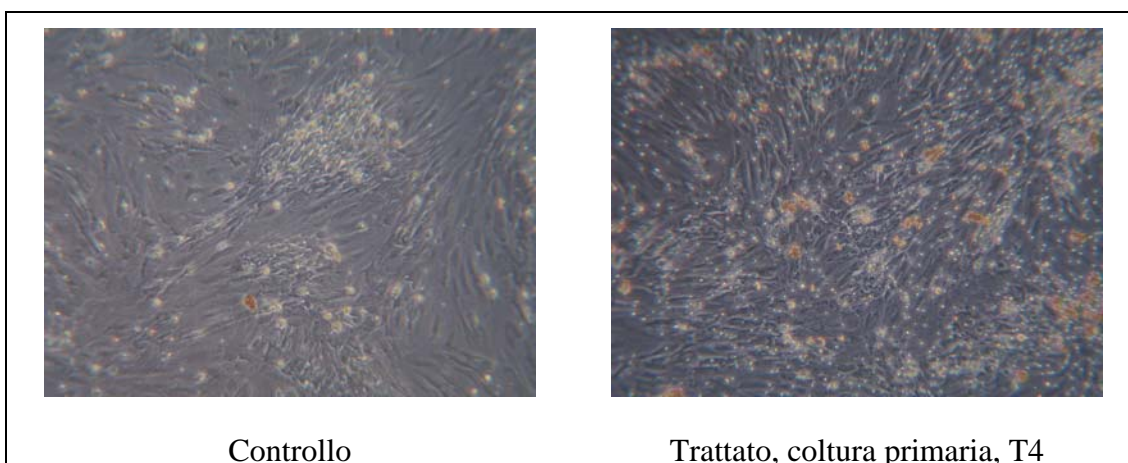
demetilante, e mostrano una ridotta capacità di crescita rispetto al campione di controllo.

3.4. Caratterizzazione morfologica

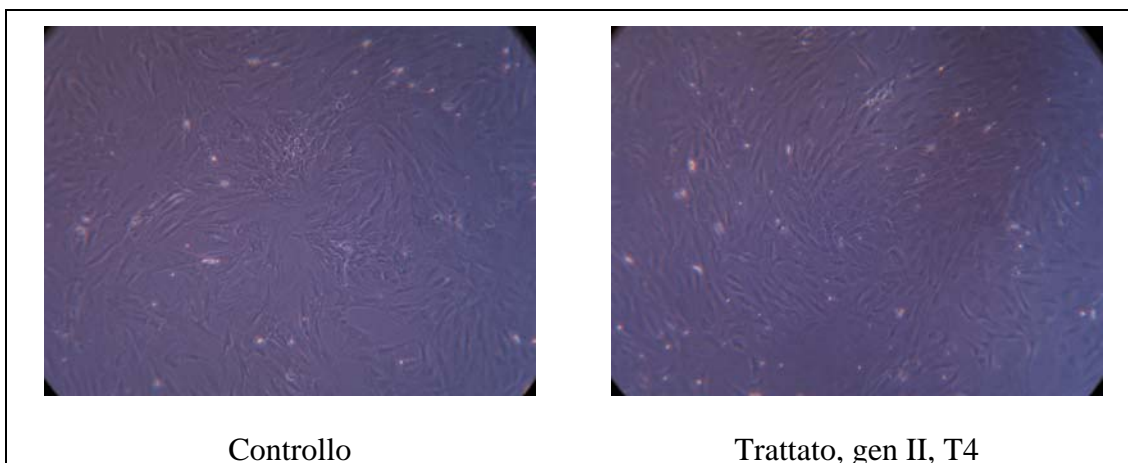
3.4.1. Microscopia ottica a contrasto di fase

Durante il periodo di incubazione e nel tempo di recupero successivo, le popolazioni cellulari, trattate con 5-Azacidina e non trattata, sono state osservate mediante microscopia ottica a contrasto di fase, per valutare la complessità intracellulare, lo spessore e il contorno delle cellule.

Dalle immagini raccolte nel tempo T4, corrispondente al termine dell'incubazione con 5-Azacidina, si può osservare che le cellule trattate non si distinguono dalle cellule della popolazione di controllo (Figura 3.5), sia per la popolazione di coltura primaria (A), sia per quella di prima generazione (B).



A



B

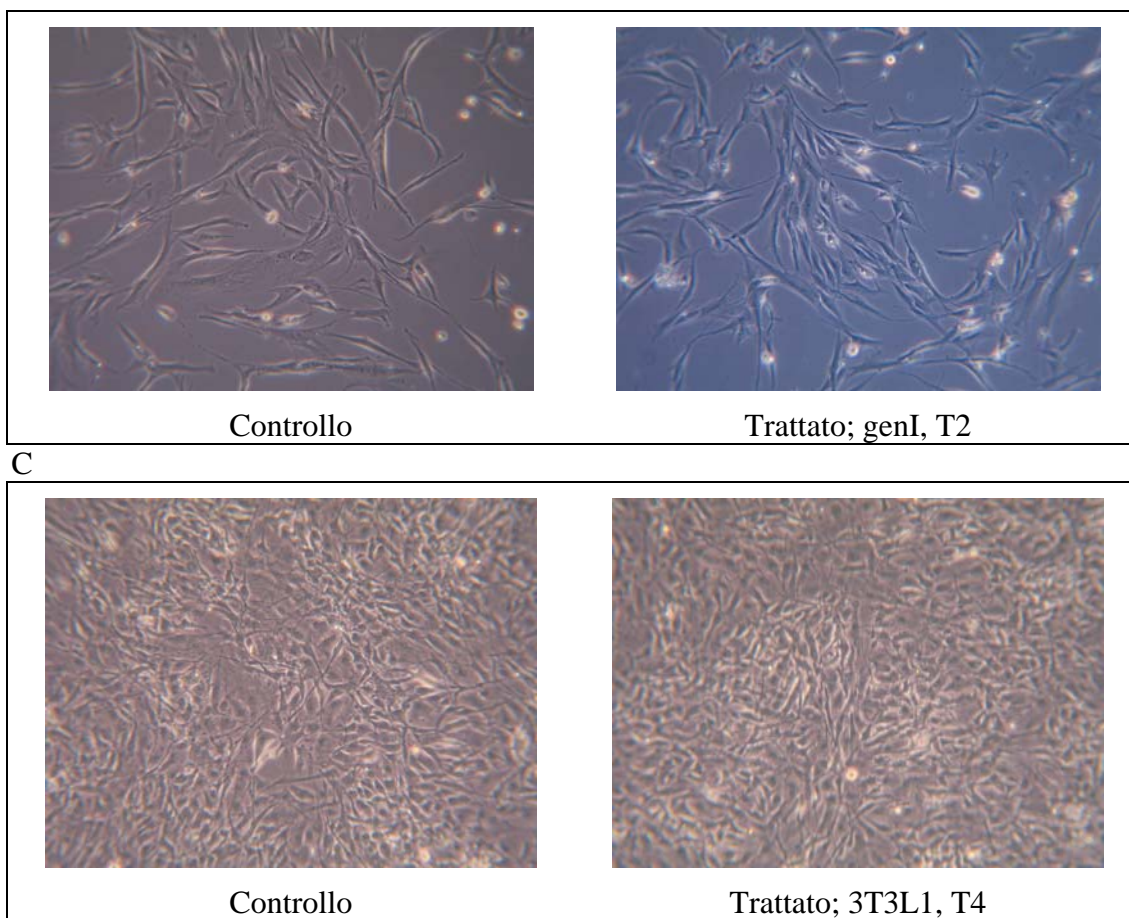
**D**

Figura 3.5 Foto di microscopia ottica a contrasto di fase, di cellule trattate e non-trattate con 5-Azacidina, durante il periodo di incubazione. Le immagini si riferiscono ad esperimenti condotti su cellule umane di coltura primaria (A) o di generazioni successive (B e C), e su cellule di linea 3T3L1 (D); nelle immagini non si osservano evidenti differenze morfologiche tra la popolazione trattata con l'agente demetilante e la popolazione di controllo, in seguito a trattamento per due giorni (C) o per 4 giorni (A, B, D).

Le immagini presentano una distribuzione casuale delle cellule ed ammassamenti cellulari irregolari, che comunemente si possono osservare nelle colture di cellule estratte da tessuto adiposo, proliferate oltre la confluenza (dato non illustrato); inoltre non è visibile il contorno cellulare, e poco contrastato appare pure il nucleo. Anche la visualizzazione di cellule dopo 48 ore (corrispondenti al T2) di incubazione con 5-Azacytidina non fornisce evidenze di variazioni morfologiche indotte dall'agente demetilante (Figura 3.5/C). Infine, è stato illustrato quanto osservato in seguito al trattamento di fibroblasti murini di linea 3T3L1, capaci di rispondere agli stimoli differenziativi adipogenici; le cellule sono state seminate e trattate con lo stesso protocollo delle cellule di derivazione umana, e le immagini (Figura 3.5/D) raccolte al

tempo T4 di incubazione con l'agente demetilante, non hanno mostrato differenze tra il trattato e controllo, come riscontrato in precedenza sulle cellule derivate da tessuto adiposo umano.

3.4.2. Microscopia a scansione elettronica

Per poter meglio caratterizzare le cellule da un punto di vista morfologico, sono state eseguite delle immagini di microscopia elettronica a scansione. Infatti, mentre con la microscopia ottica abbiamo potuto osservare distribuzione e orientamento cellulare, la microscopia elettronica a scansione permette di caratterizzare le cellule con un potere risolutivo mille volte superiore alla microscopia ottica, e fornisce informazioni sull'aspetto e sulla natura della superficie cellulare e degli strati citoplasmatici. L'immagine tridimensionale ottenuta con la microscopia a scansione elettronica mostra cellule adese ed appiattite (Figura 3.6): non ci sono punti di condensazione elettronica, riconoscibili per la luminosità di intensità variabile. I contorni cellulari sono, pertanto, difficilmente riconoscibili, anche ad ingrandimenti superiori, mentre si distingue il nucleo per la differenza di tonalità dovuta alla diversa composizione, rilevata grazie alla sensibilità della tecnica microscopica.

L'analisi comparativa è stata svolta su campioni di cellule estratte da tessuto adiposo, espanse fino alla prima generazione, e trattate con 5-Azactidina 10uM per 4 giorni. Nelle immagini, le cellule trattate hanno dimensioni, di circa 50um, paragonabili a quelle delle cellule non trattate. L'ingrandimento permette di riconoscere in entrambe le popolazioni, la presenza di vescicole citoplasmatiche estratte dal solvente alcolico e dalle successive operazioni, per la preparazione del campione all'analisi di spettroscopia elettronica. La visione più ravvicinata permette di osservare il sottile spessore citoplasmatico e la fragilità dei contorni cellulari e di concludere che il trattamento demetilante non ha influenzato le caratteristiche morfologiche.

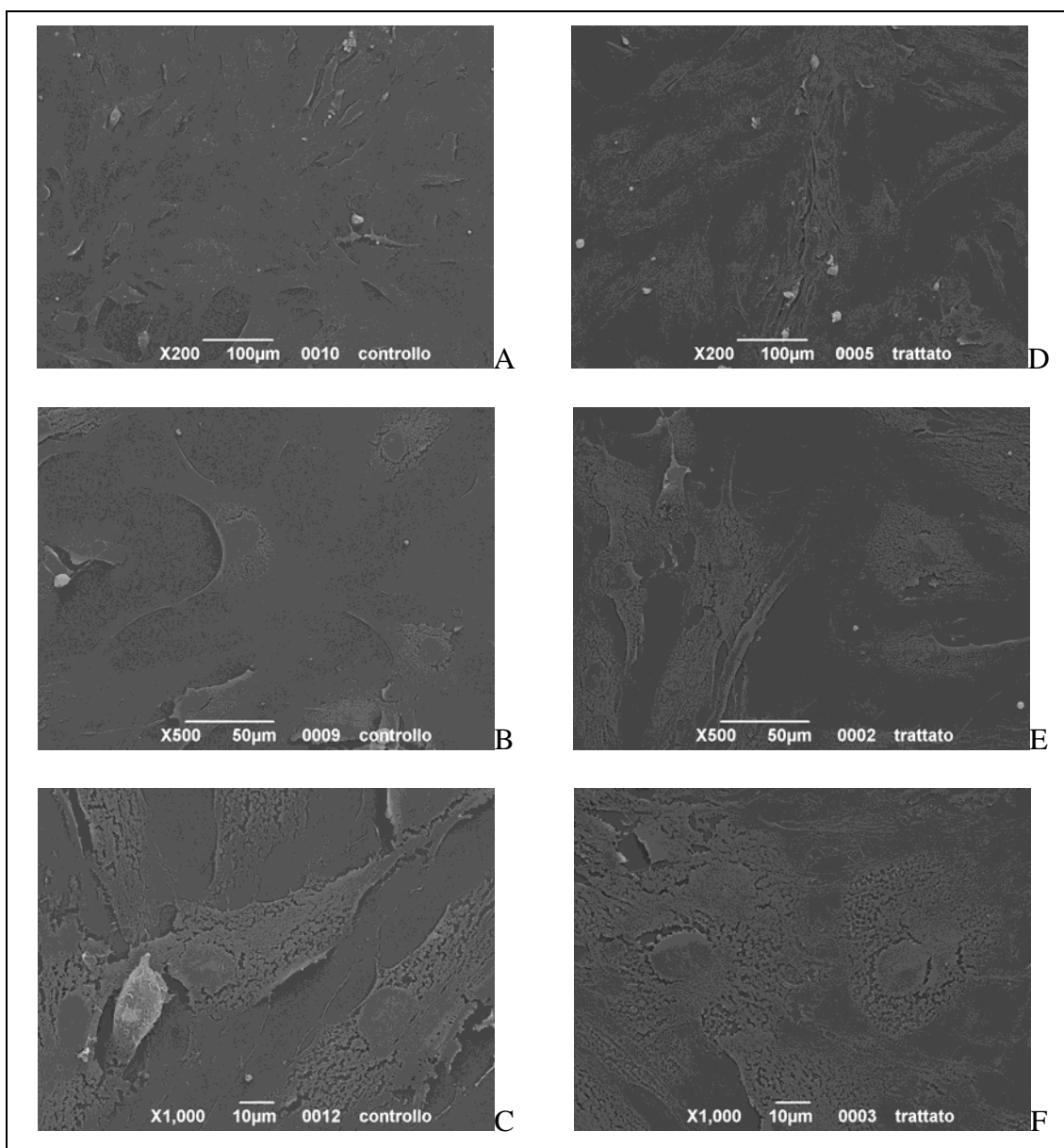


Figura 3.6 Immagini di microscopia elettronica a scansione di cellule trattate con agente 5-Azacidina 10µM, al termine del periodo di incubazione. Le immagini presentano diversi ingrandimenti (200-1000x), di entrambe le tipologie cellulari: trattato (D-F) e controllo (A-C).

3.5. Effetto della 5-Azacidina sulla capacità di differenziamento

E' ampiamente riconosciuta la capacità multi potente delle cellule derivate da tessuto adiposo; esse, infatti, sono in grado di differenziarsi in diverse *lineages* cellulari, e comparabilmente alle cellule derivate da midollo osseo (Freitas, et al. 2006; Aust, et al. 2004; Mizuno, et al. 2002). Per questa ragione, è stato studiato l'effetto del

trattamento con l'agente demetilante sulla capacità multidifferenziativa in cellule estratte da tessuto adiposo di I-III generazione.

Di seguito sono riportate foto di microscopia ottica in campo chiaro di campioni di cellule trattate e non trattate con l'agente demetilante, e poi indotte al differenziamento in senso adipogenico, osteogenico e miogenico (Figure 3.7-3.9); per valutare la risposta al trattamento differenziativo, i campioni sono stati saggiati con le consuete analisi citochimiche. Per il differenziamento adipogenico, le cellule sono state colorate con Oil Red O, sostanza lipofila che mette in evidenza le vescicole lipidiche caratteristiche delle cellule adipose mature.

Nelle immagini relative al differenziamento adipogenico non si distinguono le colture trattate con 5-Azacidina (Figura 3.7/B-C) rispetto a quelle di controllo (E-F); la distribuzione e la grandezza dei vacuoli lipidici, colorati con la sostanza Oil Red O, è paragonabile nei due campioni.

La colorazione di contrasto con ematossilina mette in evidenza la scarsità di vacuoli lipidici citoplasmatici nelle cellule prima dell'induzione al differenziamento (A e D): inoltre, in queste foto, non si osservano differenze morfologiche tra le due colture cellulari, trattato e controllo.

Simili conclusioni si possono ricavare dalle cellule mantenute in coltura monostrato in terreno differenziativo osteogenico, dopo il trattamento demetilante. Il differenziamento verso la linea osteogenica è stato analizzato mediante la valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina e dello stato di mineralizzazione della matrice. Le immagini mostrano la colorazione dell'attività fosfataseica, presente negli osteoblasti e nelle colture in differenziamento osteogenico (Figura 3.8); la fosfatasi alcalina è già presente nella popolazione di partenza (A e C), perché questa è eterogenea e composta da una piccola componente cellulare *committed* in senso osteogenico (Kern, et al. 2006).

Alla terza settimana di induzione al differenziamento si osserva attività fosfataseica, sia nel campione precedentemente trattato con 5-Azacidina (Figura 3.8/D) sia in quello di controllo (B).

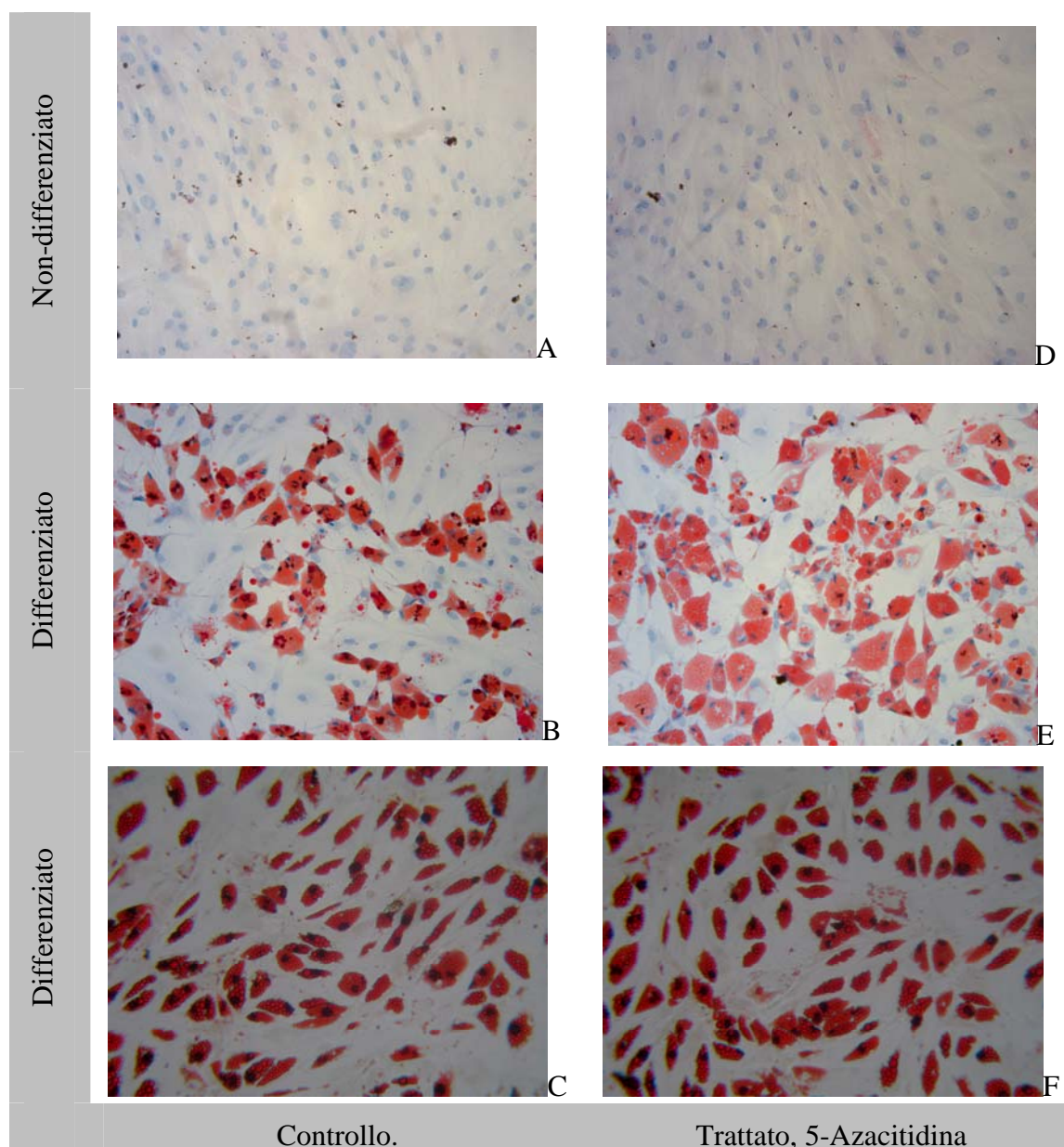


Figura 3.7 Differenziamento adipogenico in popolazioni trattate e non trattate con 5-Azacidina 10uM. Colorazione Oil Red O/Ematossilina in cellule, derivate da tessuto adiposo, di seconda generazione; dopo l'espansione, le cellule sono state trattate con 5-Azacidina e, al termine del periodo di incubazione, sono stati aggiunti i fattori adipogenici, insulina, desometasone, indometacina e isobutilmetilxantina. Il pannello mostra i campioni cellulari, demetilato (A-C) e controllo non-demetilato (D-F), prima dell'induzione al differenziamento (A e D) e dopo 26giorni di differenziamento (B-C, E-F). (Igrandimento 200x.)

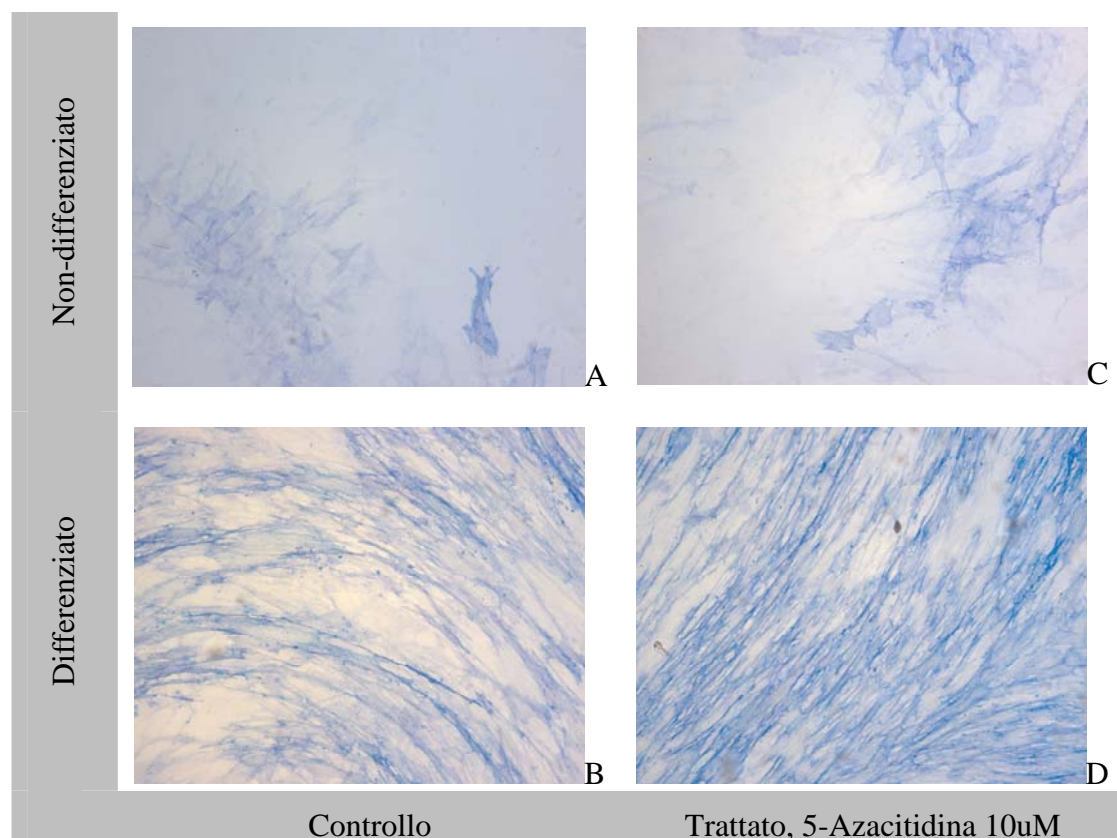


Figura 3.8 Differenziamento osteogenico in popolazioni trattate con 5-Azacidina 10uM. Rilevazione dell'attività della fosfatasi alcalina, quale fattore coinvolto nel differenziamento osteogenico, in cellule derivate da tessuto adiposo, espanse fino alla II generazione e, dopo trattamento demetilante, indotte al differenziamento osteogenico. I campioni sono stati fissati e colorati prima di indurre il differenziamento (A e C) e dopo tre settimane di differenziamento (B e D), in campioni trattati con 5-azacidina (C e D) e non trattati (A e B). (Ingrandimento: 100X)

Il risultato dell'attività fosfataseica è paragonabile a quello ottenuto con la colorazione von Kossa, che mette in evidenza i sali di calcio cristallizzati nella matrice prodotta da cellule in differenziamento osteogenico. Per questo esperimento, le cellule di seconda generazione sono state trattate con 5-Azacidina e successivamente, indotte al differenziamento osteogenico; dopo 28 giorni di differenziamento, i campioni sono stati fissati per la colorazione. Le immagini B ed E (Figura 3.9) ritraggono raggruppamenti cellulari, tipici delle colture in differenziamento osteogenico; in corrispondenza delle zone maggiormente colorate di rosa, come prova della colonizzazione cellulare, si osservano le macchie marroni tendenti al nero, che permettono di riconoscere i depositi di mineralizzazione.

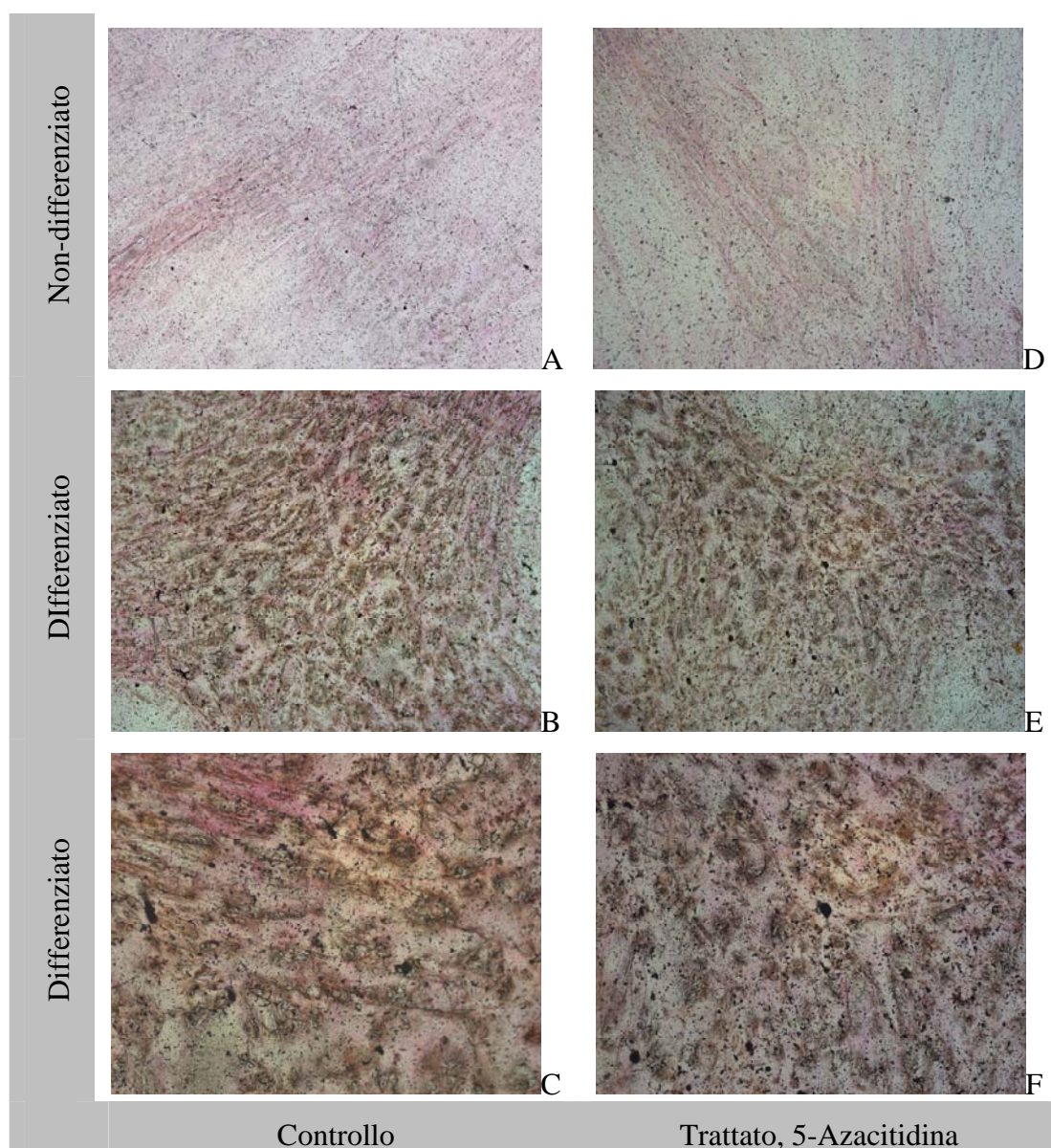


Figura 3.9 Differenziamento osteogenico in popolazioni trattate e non trattate con 5-Azacidina 10uM. Colorazione di von Kossa in campioni di cellule derivate da tessuto adiposo di seconda generazione, e differenziate in senso osteogenico, dopo essere state trattate con l'agente demetilante 5-Azacidina 10uM. La colorazione permette di valutare il grado di mineralizzazione della matrice prodotta dalle cellule in differenziamento osteogenico dopo 28 giorni di differenziamento (B-E, ingrandimento 200x) e (C-F, ingrandimento 400x)). Le immagini A e D mostrano i campioni cellulari trattato 5-Azacidina (B) e controllo (A) prima dell'induzione al differenziamento; i campioni differenziati precedentemente trattati con 5-Azacidina (B-C) non mostrano sostanziali differenze rispetto ai campioni di controllo (E-F): le tracce nere/marroni sono depositi di calcio mineralizzato, mentre la colorazione rosa identifica il citoplasma cellulare.

Nelle foto a ingrandimento superiore (C e F) sono indistinguibili i contorni cellulari e le tracce di mineralizzazione sono esigue rispetto a quelle che potremmo

osservare in colture di osteoblasti di linea. Ciononostante il confronto tra i campioni differenziati e non-differenziati permette di dire che le cellule hanno subito un cambiamento. D'altro lato, non si osserva differenza tra i campioni trattati 5-Azacidina (E e F) e non-trattato (Be C), come osservato in precedenza.

Infine i campioni cellulari demetilati e non-demetilati con 5-Azacidina, sono stati indotti al differenziamento miogenico; la ricerca dei marcatori Myod e miogenina, al termine di due settimane di differenziamento, non ha prodotto dati positivi. Osservando i campioni alla microscopia ottica, non sono state rilevate cellule polinucleate o strutture mio tubulari (dati non illustrati).

In conclusione, il trattamento demetilante con 5-Azacidina non sembra influire sulla capacità di differenziamento delle cellule derivate da tessuto adiposo; la multipotenzialità delle cellule isolate da tessuto adiposo, riportata in letteratura e in parte testata in questo studio, non è stata inibita da un eventuale de-differenziamento, indotto dal trattamento demetilante. D'altro lato, il trattamento con 5-Azacidina non sembra aver potenziato la risposta ai fattori adipogenici ed osteogenici. Nonostante la 5-azacidina sia un fattore determinante per l'induzione al differenziamento miogenico, non è stata raccolta nessuna evidenza nei campioni trattati, comparabilmente a quanto ottenuto dai campioni di controllo.

3.6. Effetto della 5-Azacidina sull'attività metabolica della cellula estratta da tessuto adiposo

Per studiare l'effetto dell'agente demetilante sull'attività metabolica specifica dei preadipociti è stata valutata la lipoproteina lipase (LPL) (Grafico 3.4), associata alla capacità della cellula di sintesi lipidica e lipolisi (Ailhaud, et al. 1992).

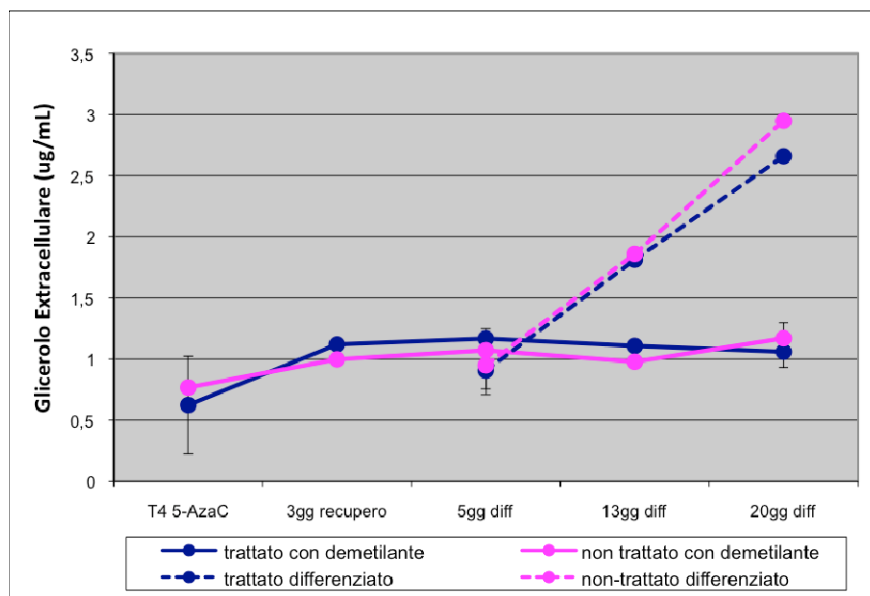


Grafico 3.4 Concentrazione del Glicerolo Extracellulare. Per misurare la quantità di glicerolo extracellulare i campioni di terreno di coltura sono stati raccolti al termine del trattamento demetilante, dopo tre giorni di recupero in terreno proliferativo e durante il differenziamento adipogenico. I campioni di terreno di coltura sono stati raccolti dopo 3-4 giorni dall'ultimo cambio, e saggiati con il kit Sigma per l'analisi del glicerolo libero. L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative nella concentrazione di glicerolo nei campioni trattati (linea blu), rispetto ai campioni di controllo (linea rosa).

La lipolisi ovvero l'idrolisi del legame tra gli acidi grassi e il glicerolo, è stata analizzata in due studi con due diversi campioni cellulari. Sono stati raccolti campioni di terreno di coltura per quantificare il glicerolo prodotto, in un preciso intervallo temporale, da campioni cellulari trattati o non-trattati con l'agente demetilante. I campioni sono stati raccolti in 5 tempi diversi: alla fine del periodo di incubazione con l'agente demetilante 5-Azadocytidine, dopo 3 giorni di recupero in terreno proliferativo e durante il periodo di differenziamento adipogenico.

Per ottenere dati statisticamente validi, sono stati raccolti tre campioni per ogni condizione di coltura; mediante la rielaborazione statistica è stato possibile osservare che non c'è differenza nella concentrazione di glicerolo extracellulare tra i campioni trattati e controlli. La concentrazione basale registrata nel periodo precedente al differenziamento adipogenico, corrisponde al fisiologico rilascio di glicerolo nell'ambiente extracellulare per lipolisi delle riserve di trigliceridi (Grafico 3.4); le cellule estratte da tessuto adiposo, mantenute a lungo in coltura, vanno incontro a perdita dei vacuoli lipidici citoplasmatici, manifestando caratteristiche morfologiche proprie dei fibroblasti (Matsumoto T, 2008). In seguito all'induzione di

differenziamento adipogenico, le cellule riversano nell'ambiente cellulare significative quantità di glicerolo rispetto alla coltura non indotta al differenziamento. L'attività metabolica indotta dai fattori differenzianti risulta comparabile tra i campioni trattati con 5-Azacidina e i non trattati, nei tre tempi considerati dopo l'induzione del differenziamento.

B: Analisi degli aspetti molecolari

Data l'eterogeneità delle popolazioni cellulari isolate da tessuto adiposo, si è stabilito di procedere all'indagine molecolare dell'effetto del trattamento demetilante, mediante due strategie: 1. espansione di cellule di coltura primaria, affinché la popolazione iniziale di cellule PLA si arricchisca di un fenotipo cellulare definito, prima del trattamento con 5-Azacidina; 2. utilizzo di due campioni di cellule PLA, differenti per il laboratorio di produzione ma non per i requisiti relativi al donatore e alla parte anatomica "lipo-aspirata", per svolgere un doppio esperimento di trattamento demetilante.

3.7. Caratterizzazione di cellule isolate da tessuto adiposo mediante liposuzione (PLA cells)

3.7.1. Caratterizzazione citofluorimetrica

Le cellule estratte da tessuto adiposo ottenuto mediante liposuzione da soggetto sano, sono state analizzate mediante citofluorimetria, subito dopo la digestione enzimatica (Figura 3.10). Per la caratterizzazione della frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo, è stato considerato il seguente pannello di marcatori di superficie: CD29-FITC, CD90-FITC, CD105-RPE, CD34-PECy5, CD44-RPE (staminalità mesenchimale), CD31-RPE (endoteliale), CD14-PE (monociti/macrofagi), HLA-DR-RPE (complesso maggiore di istocompatibilità –MHC-II), CD71-RPE e CD117-RPE (staminalità ematopoietica), CXCR4-RPE (linfocitario), CD38-FITC e CD45-RPE(leucocitari), dove "FITC" sta per fluoresceina isotiocianato, "PECy5" per ficoeritrina-cianin5 ed "RPE" per R-ficoeritrina.

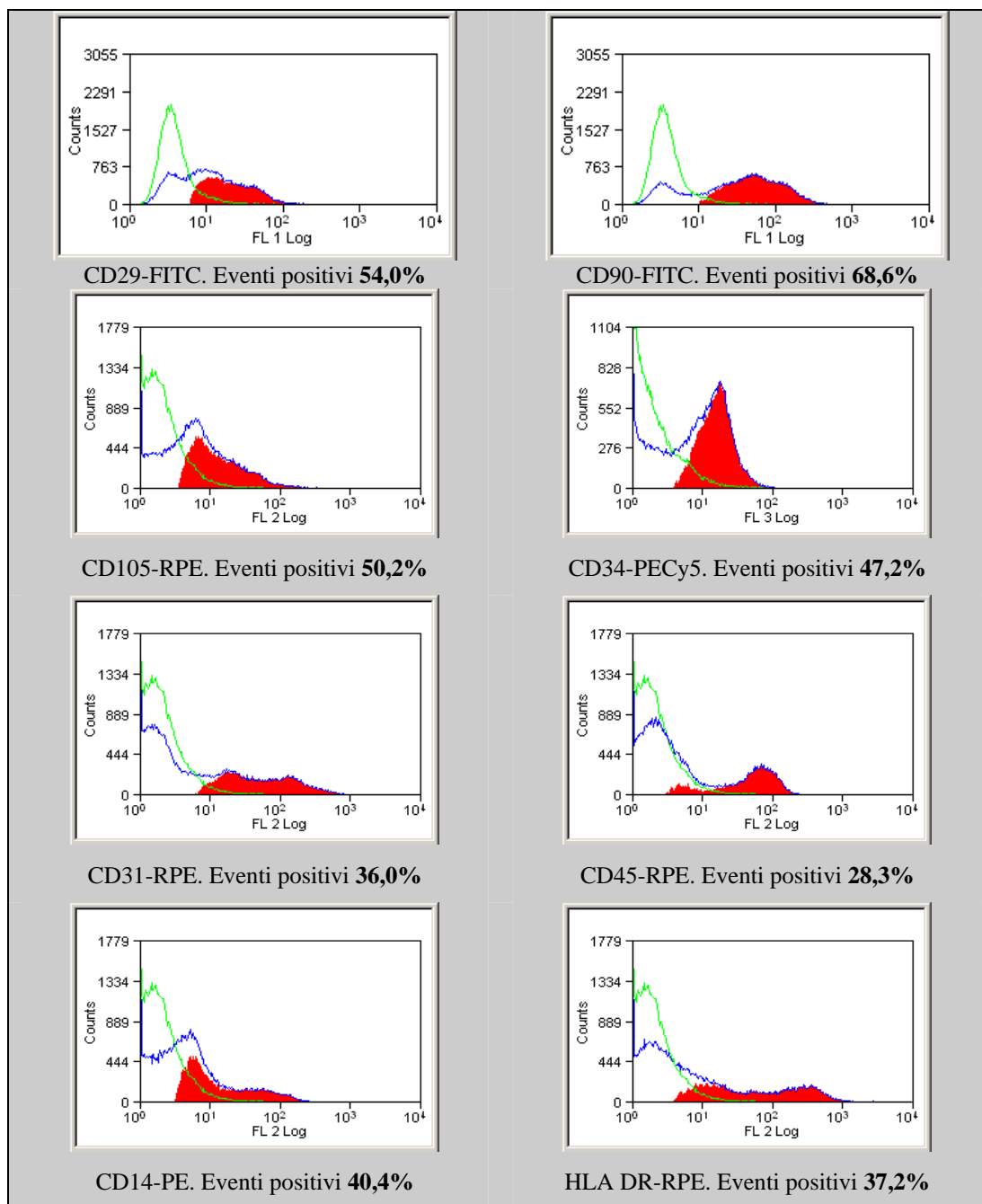


Figura 3.10 Caratterizzazione citometrica di una popolazione cellulare isolata lipo-aspirato. I grafici illustrano il numero degli eventi positivi all'anticorpo marcato (in rosso) come risultato della Overtone Substraction tra le intensità e il conteggio degli eventi registrati (in blu) e il segnale del controllo isotipico (in verde). I risultati dell'analisi mostrano un'incidenza media del 50% della popolazione cellulare positiva per i marcatori di staminalità mesenchimale (CD29, CD90, CD105, CD34), e valori percentuali consistenti anche per gli antigeni endoteliale ed ematopoietici (CD31, CD45, CD14 e HLA DR).

I risultati ottenuti dall'analisi (Figura 3.10) sono conformi ai dati riportati in letteratura: i marcatori di staminalità mesenchimale, riconosciuti anche nella frazione stromale del midollo osseo, sono espressi mediamente nel 50% delle cellule da lipoaspirato. In particolare le cellule CD90+ rappresentano il 64%, le CD105+ il 50,2% e le CD34+ il 47%; controtendenza è, invece, il CD44 (recettore dell'acido ialuronico e marcatore delle mesenchimali staminali), espresso solo nel 9% della popolazione cellulare. I marcatori della componente cellulare ematopoietica sono variabilmente espressi nel range di incidenza 9-37%; solo il 9,3% sono cellule CD117+ e 12% sono CD71+, mentre il 28,5% e 34,9% sono rispettivamente CD45+ e CD38+. Presente anche il recettore chemochinico CXCR4 nel 9,6% della popolazione, mentre il 37,4% ha risposto positivamente alla marcatura del MHC-II.

3.7.2. Caratterizzazione mediante colorazione ORO e microscopia a fluorescenza

Le cellule PLA, precursori degli adipociti, presentano nel citoplasma vescicole di accumulo dei lipidi neutri, che sono normalmente evidenziati con la sostanza Oil Red O (ORO) (Figura 3.11/A); queste vescicole nella fase di *commitment* e in quella iniziale di differenziamento adipogenico presentano un componente peculiare, l'ADRP (D). Per caratterizzare i preadipociti è anche noto il marcatore SREBP (F), presente nel reticolo endoplasmatico come precursore, e nel nucleo nella forma attivata di fattore di trascrizione per l'induzione al differenziamento adipogenico. In realtà, la sua espressione è stata più volte visualizzata su tutto il perimetro cellulare, come nell'immagine illustrata.

Compagnano nella caratterizzazione anche i marcatori superficiali di staminalità mesenchimale CD34 e CD105 (B e C), per valutarne la distribuzione e l'intensità del segnale. Infine, è stato considerato il marcatore citoscheletrico alfa-ACTINA (G), per evidenziare l'eventuale presenza di periciti appartenenti al tessuto connettivo adiposo; e per un termine di paragone per i successivi studi di dedifferenziamento, è stata valutata la presenza del fattore di trascrizione embrionale NANOG (E), responsabile della capacità di *self-renewal* nelle cellule pluripotenti.

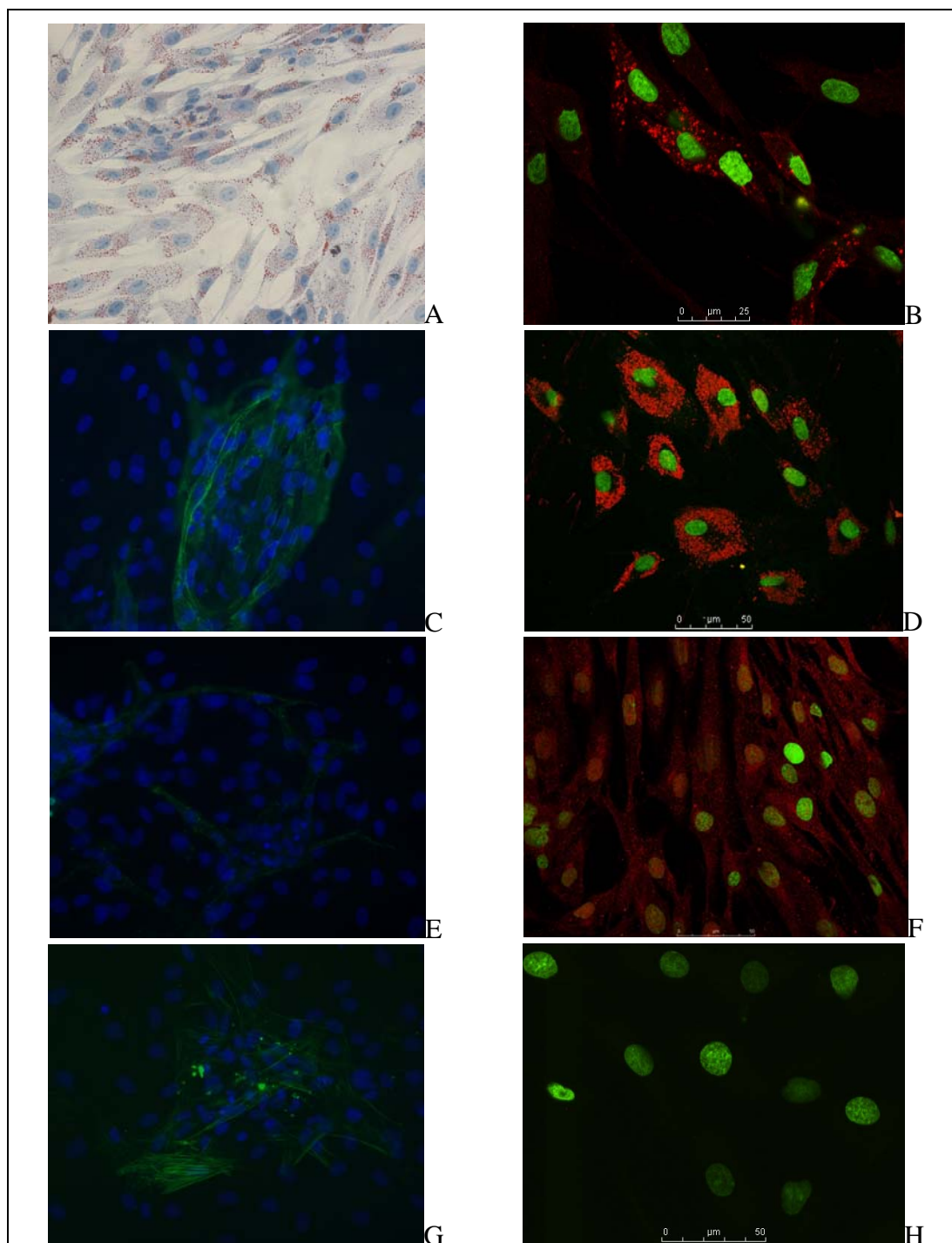


Figura 3.11 Caratterizzazione di cellule estratte da tessuto adiposo da lipoaspirato. Immagini di citochimica con colorazione ORO positiva (A). Epifluorescenza verde (FITC) per i marcatori CD105 (C), CD14 (E) e alfa-ACTINA (G) con blu-DAPI per la colorazione nucleare. Immagini di cellule CD34+ (B), ADRP+ (D), SREBP+ (F) e NANOG- (H), ottenute mediante microscopia confocale a scansione laser (LCSM). (Le immagini di epifluorescenza sono state ottenute con obj 40X; mentre per le altre foto è stato utilizzato un obj 63X per immersione in olio.)

Per lo studio dei marcatori citoplasmatici è stata utilizzata la microscopia confocale a

scansione laser; lo strumento permette di distinguere con precisione la localizzazione del segnale del fluoroforo, e quindi di definire la collocazione della proteina a livello citoplasmatico o nucleare. La proteina ADRP, per esempio, è presente sulla parete delle vescicole lipidiche citoplasmatiche, perciò nell'immagine di microscopia a fluorescenza confocale è visualizzata come piccole sfere nella zona perinucleare; il nucleo, quale riferimento spaziale, è stato evidenziato con Sytox Green, un reattivo acidofilo affine al DNA. Il marcatore CD34 rileva una proteina superficiale, che può essere immagazzinata nel citoplasma, come si può osservare per la presenza delle vescicole nel citoplasma. Il CD34 non è omogeneamente distribuito tra le cellule che compongono questa popolazione. L'analisi di immunofluorescenza dimostra la prevalenza di cellule *committed* in senso adipogenico, SREBP+, ADRP+, ORO+, e la parziale positività ai marcatori di staminalità mesenchimale CD34 e CD105. Risultai, inoltre, che la popolazione è eterogenea per la presenza di cellule col fenotipo del monocita/macrofago (CD14+), e periciti, alfa-ACTINA+. Infine, la ricerca di cellule NANOG+ non ha dato esito positivo.

3.8. Caratterizzazione delle cellule espanse fino alla IV generazione

L'indagine molecolare sull'effetto dell'agente demetilante 5-Azacidina è stato condotto su una popolazione cellulare resa omogenea per semplice espansione della stessa fino alla quarta generazione. Per questo studio, le cellule PLA sono state espanse dalla prima alla quarta generazione; ad ogni passaggio, sono stati raccolti i campioni per l'analisi citometrica (Tabella 3.1) e per le indagini di microscopia confocale (Tabella 3.2), sui marcatori descritti in precedenza.




















Come riportato in letteratura (Mitchell, et al. 2006), i risultati di citofluorimetria mostrano che già al terzo passaggio l'immunofenotipo ha subito una notevole variazione, con riduzione della quota di cellule CD14+, CD31, CD38+ CD45+. Anche il segnale del marcatore di staminalità mesenchimale risulta meno presente, al contrario dell'aumento di espressione di CD29, CD105 e CD90, noti marcatori di riconoscimento delle cellule derivate da midollo osseo.

Rimangono invariati i valori relativi ai marcatori della linea ematopoietica, presenti in un *range* di percentuali molto variabile.

Tabella 3.1 Riassunto dell'analisi citofluorimetrica delle cellule PLA in espansione. I risultati sono relativi ad un unico esperimento di espansione e caratterizzazione. La tabella mostra una variazione nel fenotipo delle cellule stromali adipose, che perde alcune caratteristiche ematopoietiche, mentre diventa più congrua la componente cellulare CD29+, CD90+ e cd105+. I risultati forniscono un fenotipo abbastanza omogeneo, già alla terza generazione, di una popolazione prevalente CD31-/CD34-/CD44-/CD90+/CD105+.

	Coltura primaria (%)	Generazione I (%)	Generazione II (%)	Generazione III (%)	Generazione IV (%)
CD29	54	39.2	53.7	61	51.4
CD31	36	40.5	4.4	2.5	2.6
CD34	47	0	3.8	0.2	0
CD44	9	19.8	2.5	12.5	5.2
CD38	34.9	21.3	14.4	3.7	7
CD14	40	0	2.2	3.1	12.4
HLA-DR	np	48	6.1	7	25.7
CXCR4	9.6	24.1	2.9	4.2	7.7
C-KIT	9.3	0	3.5	9.1	13.18
CD90	68.6	33.6	65.7	79.2	48.5
CD105	50	62	87.8	92.4	81.6
CD71	12.4	39.8	44.8	35.9	24.6
CD45	28.3	20.5	7.7	13.4	8.9

Tabella 3.2 Sommario dei risultati della caratterizzazione della popolazione PLA in espansione, mediante colorazione ORO ed immunofluorescenza. La tabella presenta un quadro riassuntivo ed immediato dei risultati dell'analisi di caratterizzazione; essa è supportata da pannelli illustrativi dei cambiamenti nella morfologia cellulare e relativi ai marcatori che hanno dato risultati maggiormente interessanti.

	Generazione I	Generazione II	Generazione III	Generazione IV
				negativo
ADRP		negativo	negativo	negativo
SREBP				
CD105				
STRO1	negativo			
Alfa-ACTIN				

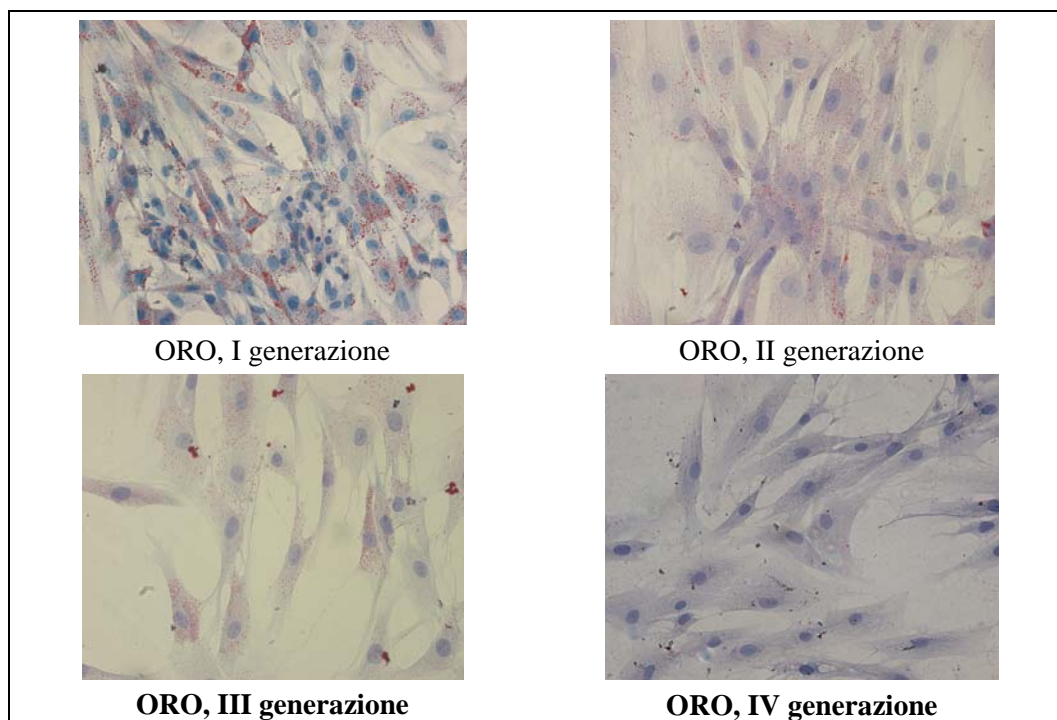


Figura 3.12 Colorazione ORO/Ematossilina. Nei quattro passaggi generazionali si osservano: riduzione del segnale ORO positivo, fino alla scomparsa, e aumento delle dimensioni cellulari.

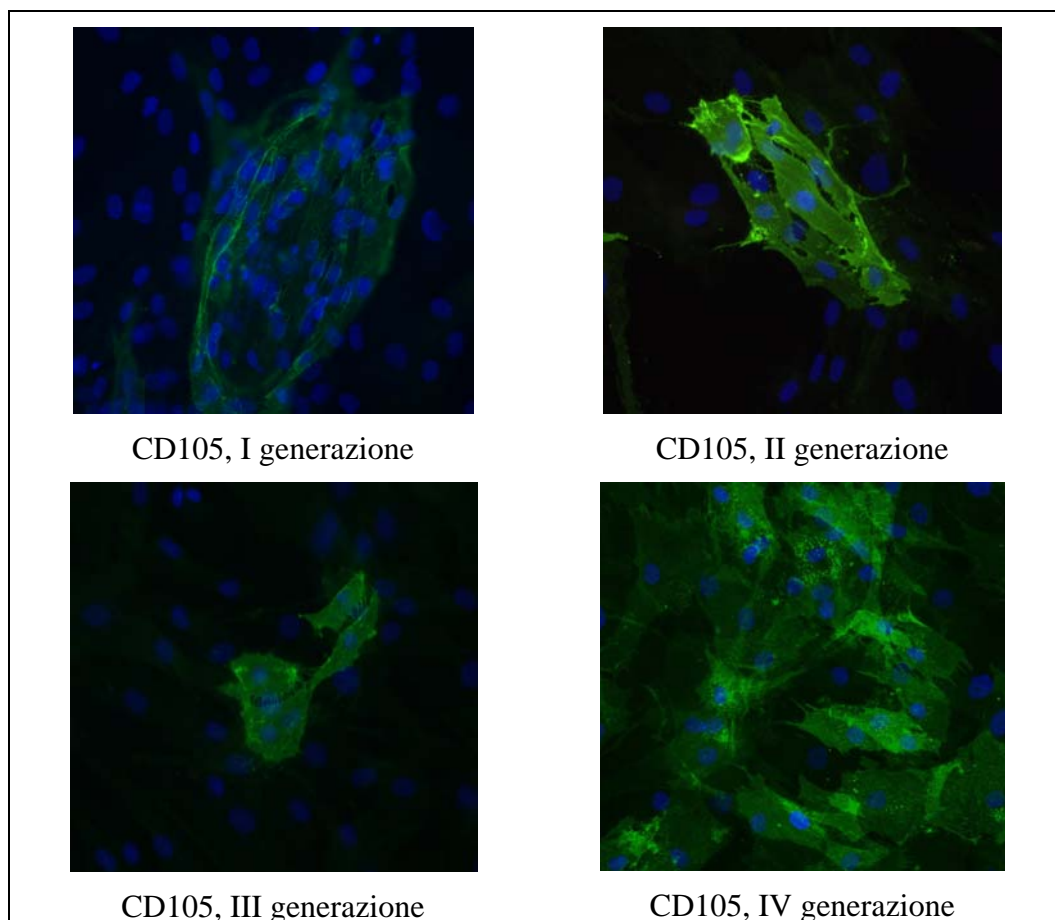


Figura 3.133 Omogeneità di espressione del marcatore CD105, nella IV generazione. A partire dalla prima generazione, il segnale (verde) delle cellule CD105+ appare evidente nella superficie. La componente CD105+ non cambia la sua incidenza all'interno della popolazione fino alla terza generazione; l'immagine relativa alla generazione successiva, infatti, mostra una distribuzione consistente dell'espressione di CD105 sia a livello superficiale che in forma di vescicole citoplasmatiche.

Nei quattro passaggi generazionali diminuisce la positività alla colorazione ORO (Figura 3.12), sebbene l'espressione dello SREBP rimanga invariata (Tabella 3.2); le cellule quindi mantengono il *commitment* in senso adipogenico. Ma è stato anche registrato un aumento della quota di cellule CD105+ (Figura 3.13), ed è comparsa alla terza generazione il segnale di positività allo STRO1 (Figura 3.14). Lo STRO1 è un marcatore di superficie, ma nella popolazione di terza generazione le cellule positive allo STRO1 hanno mostrato espressione citoplasmatica e solo nella generazione successiva la distribuzione del segnale si è estesa in modo omogeneo sulla superficie cellulare. Questa osservazione potrebbe far pensare che la popolazione mantenuta in coltura per molto tempo e per diversi passaggi vada incontro ad un importante cambiamento fenotipico.

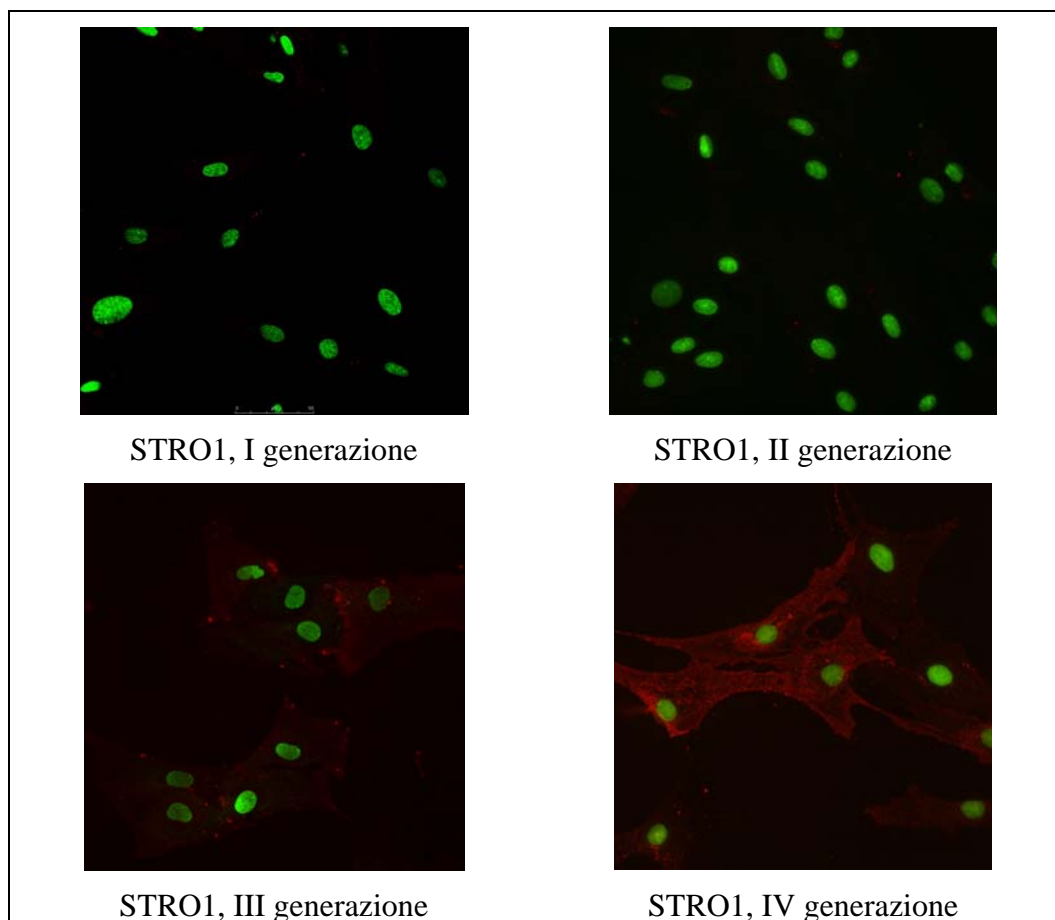


Figura 3.14 Comparsa del marcatore di staminalità mesenchimale STRO1 alla terza generazione. Il segnale STRO1 (rosso) compare nella terza generazione; è poco espresso a livello superficiale mentre sono evidenti piccole vescicole di accumulo in corrispondenza del contorno cellulare. Nella quarta generazione, invece, l'espressione diventa più evidente in superficie.

3.9. Effetti del trattamento demetilante sull'espressione di marcatori specifici in popolazione cellulare CD105+/CD90+/SREBP+/STRO1+/ORO-/ADRP-

Le cellule di quarta generazione, caratterizzate in precedenza, sono state seminate per l'incubazione con l'agente demetilante, secondo il protocollo descritto in Figura (Fig 3.14): dopo due giorni di coltura in terreno proliferativo, le cellule sono state incubate in presenza (trattato) o in assenza (controllo) dell'agente demetilante, per un periodo di 4 giorni senza cambio di terreno (T1-T4). Successivamente, i campioni sono stati mantenuti in terreno proliferativo per un periodo di recupero di 6 giorni, ed espansi per la valutazione degli effetti del trattamento sulle generazioni ulteriori. I campioni per le indagini molecolari mediante microscopia e *Western Blotting* (WB) sono stati

raccolti sia dopo il trattamento demetilante, in corrispondenza del tempo T4 sia al termine del periodo di recupero.

Supponendo che il trattamento demetilante possa determinare sostanziali modifiche a livello proteomico, lo studio del fenotipo ha interessato anche una delle generazioni successive al trattamento.

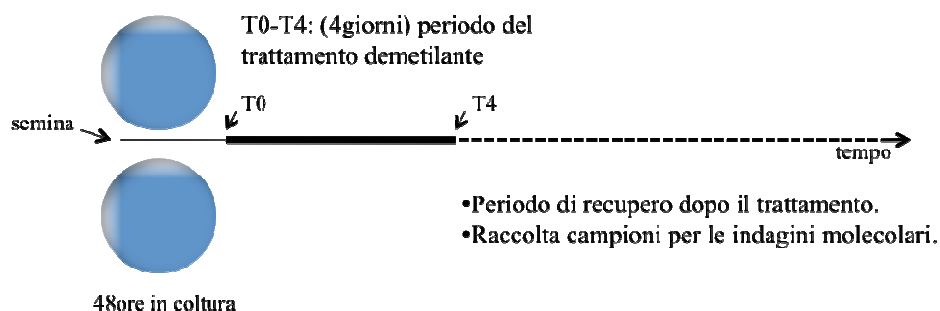


Figura 3.14 Schema sperimentale dell'indagine molecolare su cellule trattate con agente demetilante.

Di seguito sono riportati i risultati di immunofluorescenza ottenuti dagli esperimenti condotti con le cellule PLA descritte nei paragrafi precedenti.

I marcatori considerati per l'indagine dell'effetto dell'agente demetilante sono parte di quelli considerati per la caratterizzazione illustrata in precedenza, relativa al medesimo campione di tessuto adiposo. Al pannello di anticorpi, però, è stato aggiunto l'anti-OCT4, fattore di trascrizione embrionale, la cui espressione è stata ripristinata *in vitro* mediante trattamento demetilante (Roche, et al. 2006). Il fattore di trascrizione OCT4 è oggetto di studio nella riprogrammazione epigenetica (Takahashi, et al. 2007), e che, assieme al NANOG, è considerato cruciale per la riaccensione delle qualità staminali pluripotenti (Alberio, et al. 2006).

La Tabella 3.3 riassume i dati raccolti in seguito al trattamento della IV generazione, alla fine del trattamento (T4) e al termine del periodo di recupero di 6 giorni (T4+6gg), e i risultati relativi alla VII generazione, ottenuta per espansione delle popolazioni di trattato e controllo, dopo l'esperimento di demetilazione. Dall'analisi si osserva che l'espressione dei marcatori CD105 e SREBP rimane invariata; non è stato registrato il segnale STRO1, e rimangono negative le indagini sull'espressione di NANOG e OCT4, come pure il marcatore tessuto-specifico ADRP.

Di seguito sono riportati i risultati relativi al trattamento demetilante nella popolazione di IV generazione descritta nella Tabella 3.3, posta a confronto con i risultati osservati

nell'esperimento con la I generazione dello stesso campione di cellule PLA di origine, trattata con il medesimo schema sperimentale. Nella marcatura dell'antigene CD105 (Figura 3.16) si nota che il trattamento demetilante non modifica l'espressione del CD105 nelle due popolazioni, diverse solo per la generazione, mentre si osserva che la popolazione di IV generazione è diventata 100% CD105+, variazione imputabile all'espansione generazionale.

Tabella 3.3 Risultati dell'analisi di immunofluorescenza sui campioni trattati (T) e i campioni di controllo (C) della popolazione di IV e VII generazione.

	T4, generazione IV		T4 + 6gg, generazione IV		Generazione VII (dopo trattam.)	
	Trattato	Controllo	Trattato	Controllo	Trattato	Controllo
ADRP	--	--	--	--	--	--
SREBP	--	--	--	--	--	--
STRO1	--	--	--	--	--	--
aACTINA	+	+	+	+	+	+
CD105	+	+	+	+	+	+
NANOG	--	--	--	--	--	--
OCT3.4	--	--	--	--	--	--
ORO	--	--	--	--	--	--

L'espressione dello SREBP (Figura 3.17) scompare sia a livello citoplasmatico sia a livello nucleare nel campione di IV generazione, trattato e controllo, diversamente da quanto registrato per la generazione I. La ricerca dello SREBP mediante Western Blotting (Figura 3.18) permette di rilevare una banda poco pronunciata ma presente, ad indicare che anche nei campioni negativi alla microscopia confocale potrebbe essere presente la proteina.

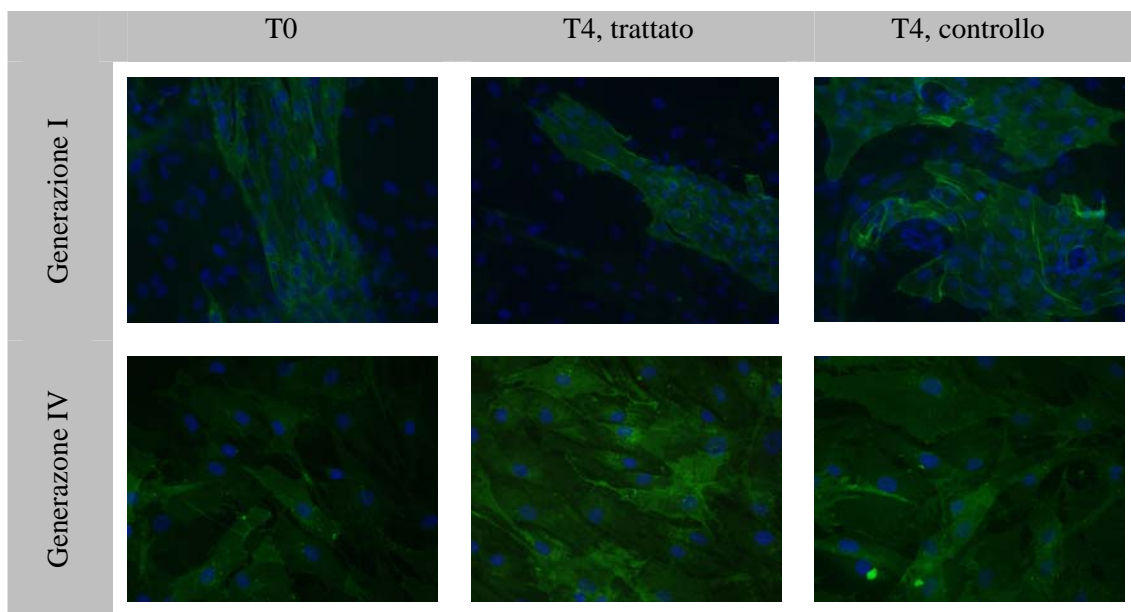


Figura 3.15 Espressione di **CD105** (verde) nella popolazione all'inizio dell'esperimento di demetilazione (T0) e al termine del periodo di incubazione con 5-Azacitidina (T4, trattato e controllo), relative alle generazioni I e IV.

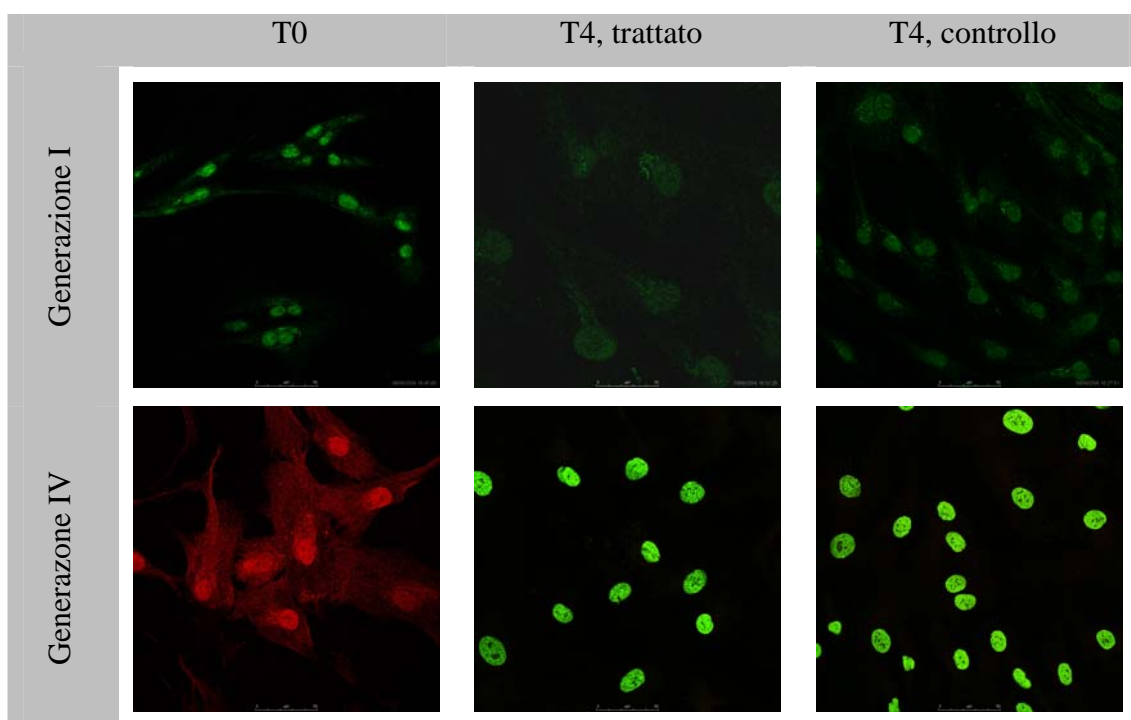


Figura 3.16 Espressione di **SREBP** (rosso) nella popolazione all'inizio dell'esperimento di demetilazione (T0) e al termine del periodo di incubazione con 5-Azacitidina (T4, trattato e controllo), relative alle generazioni I e IV.

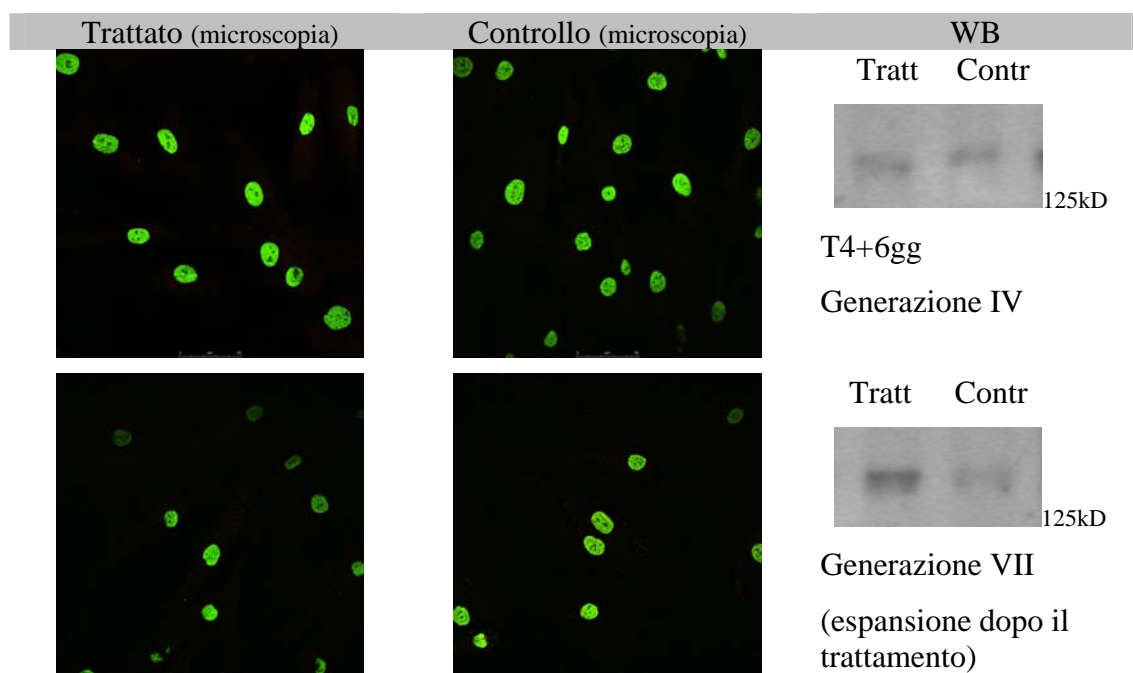


Figura 3.17 Immagini di microscopia a fluorescenza e di Western Blotting (WB) relative allo SREBP. La ricerca dell'espressione dello SREBP mediante WB, smentisce i risultati di immunofluorescenza; inoltre, si nota un segnale più marcato riferito al campione trattato, e lasciato espandere fino alla VII generazione.

Nelle foto di microscopia confocale relative all'espressione dell'ADRP (Figura 3.19) nelle cellule di I generazione, sono perfettamente visibili le vescicole di grasso, di forma rotondeggiante, che occupano quasi per intero il citoplasma cellulare, lasciando lo spazio al nucleo (verde o privo di segnale). Scenario completamente diverso per i campioni cellulari di IV generazione, per cui non si osserva espressione di ADRP e rimane il segnale verde del nucleo ad indicare la presenza delle cellule. La ricerca dell'espressione dell'ADRP mediante WB conferma l'assenza nella popolazione di IV generazione (Figura 3.20), mentre, in corrispondenza dei campioni T e C della VII generazione, compare il segnale dell'ADRP, in disaccordo con i risultati di LSCM (non illustrati). Infine, non si osservano differenze tra i dati raccolti dai campioni trattati rispetto ai relativi controlli in merito all'espressione di questo fattore tessuto-specifico.

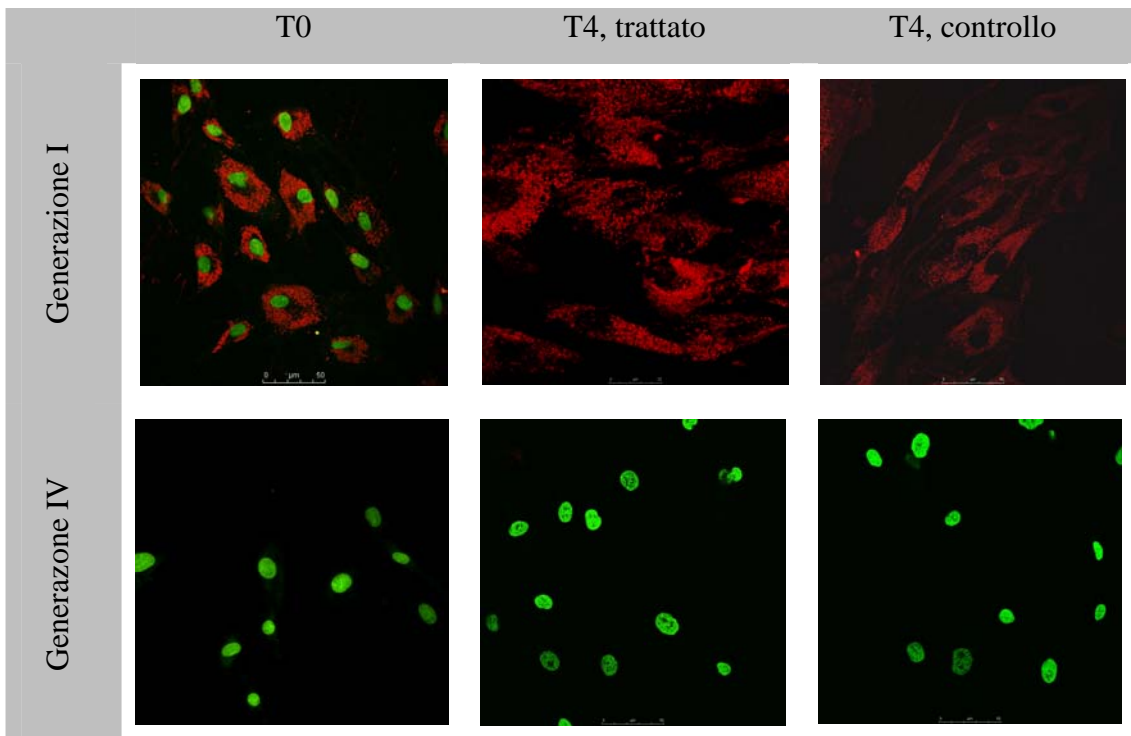


Figura 3.18 Marcatura con Alexa-594 (rosso) della proteina ADRP, presente nella parete delle vescicole citoplasmatiche delle cellule di prima generazione prima e dopo il trattamento demetilante.

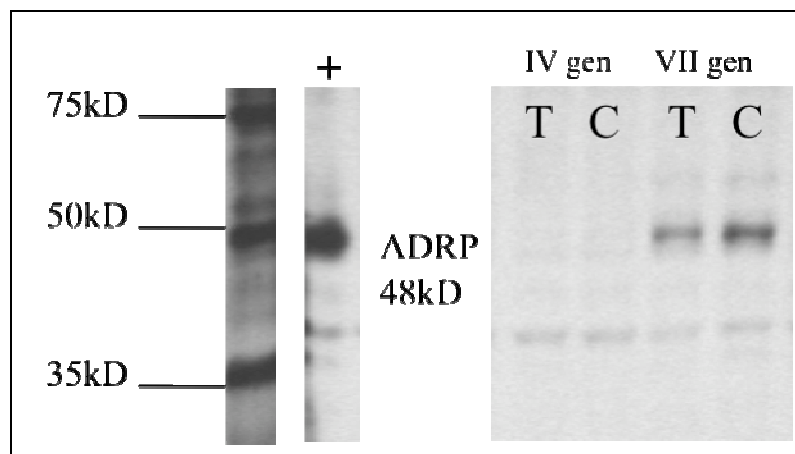


Figura 3.19 Risultati di WB relativi all'espressione di ADRP (48kD) in campioni di cellule di IV e VII generazione trattate (T) e non-trattate (C) con 5-Azacidina. In particolare, si osserva assenza della proteina nei campioni relativi alla IV generazione, raccolti al termine del periodo di recupero successivo al trattamento; i risultati di WB confermano quelli ottenuti con indagini di microscopia confocale. A destra, rilevazione di espressione di ADRP nella VII generazione, ottenuta per espansione cellulare della popolazione trattata.

In conclusione, non sono state raccolte evidenze dell'effetto del trattamento demetilante sull'espressione proteica in una popolazione arricchita nella componente CD105+/CD90+. L'insensibilità delle cellule di IV generazione alla presenza dell'agente demetilante sembra quindi paragonabile alle cellule di I generazione, perché ugualmente il trattamento demetilante non altera l'espressione di proteine presenti (CD105; SREBP; ADRP; alfa-ACTINA), o non espresse (OCT4; NANOG).

3.9. Esperimento di confronto tra due popolazioni cellulari di preadipociti estratti da lipoaspirato.

Per continuare l'indagine molecolare sull'effetto della demetilazione su cellule PLA, è stato condotto un esperimento in doppio con due tipologie cellulari, differenti per il laboratorio di estrazione della popolazione cellulare e per il campione di tessuto adiposo manipolato. I modelli cellulari non divergono per la tecnica chirurgica di estrazione del tessuto (liposuzione) e per la metodica di isolamento della popolazione cellulare (digestione enzimatica con Collagenase IA). In questo paragrafo si definisce: campione/popolazione 1 la coltura cellulare isolata nel nostro laboratorio, da campione di tessuto adiposo sottocutaneo addominale di soggetto sano, femmina, di 30 anni, campione/popolazione 2 le cellule comperate dalla ditta Lonza, estratte da campione di tessuto omentale, ottenuto per liposuzione in soggetto sano, maschio, di 35 anni. Le due popolazioni sono state studiate contemporaneamente, sia nel periodo di espansione fino alla terza generazione sia durante l'esperimento di demetilazione, e, ugualmente, è stato condotto lo studio parallelo di citometria, microscopia e WB, per l'ottenimento di un quadro proteomico sull'effetto del trattamento con 5-Azacitidina 10uM per 4gg, come da schema già noto (Figura 3.21).

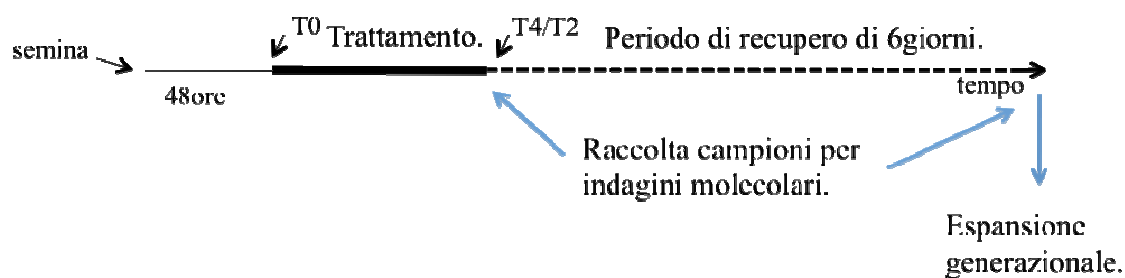


Figura 3.20 Schema sperimentale per l'esperimento in doppio. Le cellule di terza generazione sono state trattate, dopo 48 di coltura, con 5-Azacidina 10uM; rispetto ai precedenti esperimenti si è valutato un ulteriore tempo di incubazione di 2giorni. Perciò, i campioni per l'analisi molecolare sono stati raccolti al termine del periodo di incubazione T2 e T4, ed ai rispettivi tempi successivi, relativi al periodo di recupero (T2/4 + 6giorni), e alla generazione seguita all'espansione delle popolazioni trattate 2/4 giorni, e dei relativi controlli.

3.9.1. Caratterizzazione delle due popolazioni cellulari.

Prima dell'esperimento, le cellule di terza generazione sono state caratterizzate mediante microscopia (Tabella 3.4) e citometria (Tabella 3.5).

Tabella 3.4. Risultati di citochimica e microscopia confocale. La tabella riassume i dati relativi alla colorazione ORO, e all'analisi di microscopia confocale sui marcatori tessuto-specifici, associati alla prima fase di differenziamento adipogenico (ADRP, SREBP) e alla fase tardiva (trasportatore del glucosio GLUT4, recettore della leptina, ObR). Sono stati valutati i marcatori di staminalità mesenchimale (CD34, CD105) ed embrionale (OCT4 e NANOG). Le popolazioni risultano identiche, fatta eccezione per la diversa risposta ai marcatori citoscheletrici Collagene I e alfa-ACTINA. (Nella tabella il simbolo “+” indica segnale positivo; il simbolo “—”, mancanza di segnale, e quindi, esito negativo.)

	Popol. 1	Popol. 2		Popol. 1	Popol. 2
ORO	—	—	SREBP	+	+
ADRP	—	—	CD105	+	+
GLUT4	—	—	Von WILL	+	+
ObR	—	—	Collagene I	—	+
CD34	—	—	Alfa-ACTINA	+	—
STRO1	—	—			
OCT4	—	—			
NANOG	—	—			

Dalla tabella 3.5 si evince che le due popolazioni non sono identiche, ma presentano caratteristiche molecolari comuni. La componente cellulare prevalente in entrambe le popolazioni è CD105+, CD90+ e CD29+, e presenta segnale positivo per il marcatore citoplasmatico/nucleare

Le due popolazioni si differenziano per i risultati citofluorimetrici relativi alla componente cellulare endoteliale/ematopoietica e per i marcatori citoscheletrici; la popolazione-2, infatti, presenta valori superiori al 30% in riferimento a marcatori superficiali ematopoietici che risultano quasi assenti (valori sotto l'1%) nella popolazione-1. Inoltre, mentre la popolazione-1 esprime il marcatore citoscheletrico alfa-ACTINA, l'altra popolazione risulta Collagene-I+ alla microscopia confocale.

Tabella 3.5 Risultati dell'analisi citofluorimetrica. Per entrambe le popolazioni si registrano alti valori per i marcatori di staminalità mesenchimale; mentre non c'è corrispondenza per i marcatori delle componenti endoteliali/ematopoietiche.

	Popol. 1	Popol. 2
CD34	34,4 %	0,8 %
CD105	<u>92,2 %</u>	<u>94,4 %</u>
CD90	<u>80,7 %</u>	<u>91,9 %</u>
CD29	<u>72,9 %</u>	<u>85,8 %</u>
CD44	31,5 %	0 %
CD14	30,5 %	5,75 %
CD31	28,8 %	2,1 %
CD45	30,9 %	0 %
CD117	32,9 %	0,8 %
HLA-DR	30,3 %	0,6 %
CXCR4	33,7 %	0,9 %

Per meglio identificare le due popolazioni cellulari, esse sono state indotte al differenziamento adipogenico; al 5° giorno di differenziamento erano già visibili vescicole adipose, di diversa grandezza e variabilmente distribuite (Figura 3.22). Si nota ancora una differenza tra le due popolazioni: la popolazione-1, infatti, sembra più responsiva agli stimoli adipogenici, associata alla presenza di zone di iperproliferazione. In entrambi i casi si conferma la presenza di preadipociti.

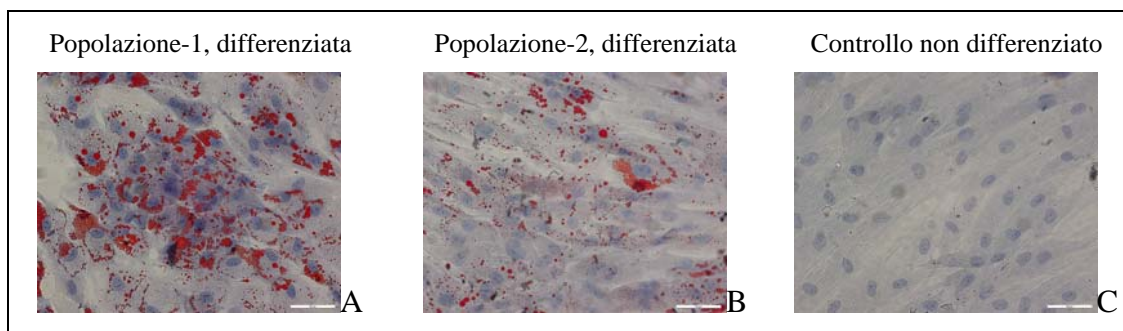


Figura 3.21 Differenziamento adipogenico nelle due popolazioni SREBP+/CD105+/ORO-/ADRP-, alla terza generazione. La colorazione ORO dimostra la capacità delle due popolazioni di rispondere agli stimoli differenziativi adipogenici: già dopo 5 giorni di coltura in terreno differenziativo le cellule mostrano vacuoli lipidici citoplasmatici (A e C) assenti nelle colture di controllo (B e C). (ingrandimento 400X).

3.9.2. Risultati dell'esperimento in doppio di demetilazione

Le tabelle 3.6 e 3.7 illustrano i risultati ottenuti mediante l'analisi di microscopia confocale, dell'indagine molecolare sull'effetto dell'agente demetilante 5-Azacidina 10uM nei due campioni di cellule PLA, caratterizzate nel precedente paragrafo. I dati si possono facilmente riassumere dicendo che l'espressione dei marcatori non cambia in seguito al trattamento con l'agente demetilante 5-Azacidina.

Inatteso, invece, il risultato relativo al marcatore di staminalità mesenchimale STRO1, specifico delle cellule estratte da midollo osseo, comparso principalmente nei campioni di controllo. Si osserva che, le cellule STRO1+ sono presenti nei campioni cellulari maggiormente mantenuti in coltura (T2+6giorni o T4+6giorni), a significare, probabilmente l'importanza della mancanza di fattori differenzianti nell'ambiente extracellulare per la capacità dedifferenziante delle cellule somatiche isolate da tessuto adiposo (Matsumoto, et al. 2008).

Vengono infine, riportati i risultati di WB relativi ai marcatori citolasmatici, SREBP (Figura 3.23 e 3.24) e ADRP (Figura 3.25), per confermarne rispettivamente la presenza e l'assenza della proteina, nei campioni trattati con 5-Azacidina e non-trattati. Le immagini sono state ottenute dall'analisi di uno dei due campioni analizzati, ma sono rappresentative dell'esito equiparabile dell'indagine.

Tabella 3.6 Analisi mediante microscopia a fluorescenza dell'effetto del trattamento demetilante sulla Popolazione-1.

	T2, gen III		T2 + 6gg, gen III		Gen V (T2+6gg)		T4, gen III		T4 + 6gg, gen III		Gen V (T4+6gg)		
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	
ADRP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SREBP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
STRO1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
CD105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NANOG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OCT3.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ORO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabella 3.7 Analisi mediante microscopia a fluorescenza dell'effetto del trattamento demetilante sulla Popolazione-1.

	T2, gen III		T2 + 6gg, gen III		Gen V (T2+6gg)		T4, gen III		T4 + 6gg, gen III		Gen V (T4+6gg)		
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	
ADRP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SREBP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
STRO1	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
CD105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NANOG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OCT3.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ORO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

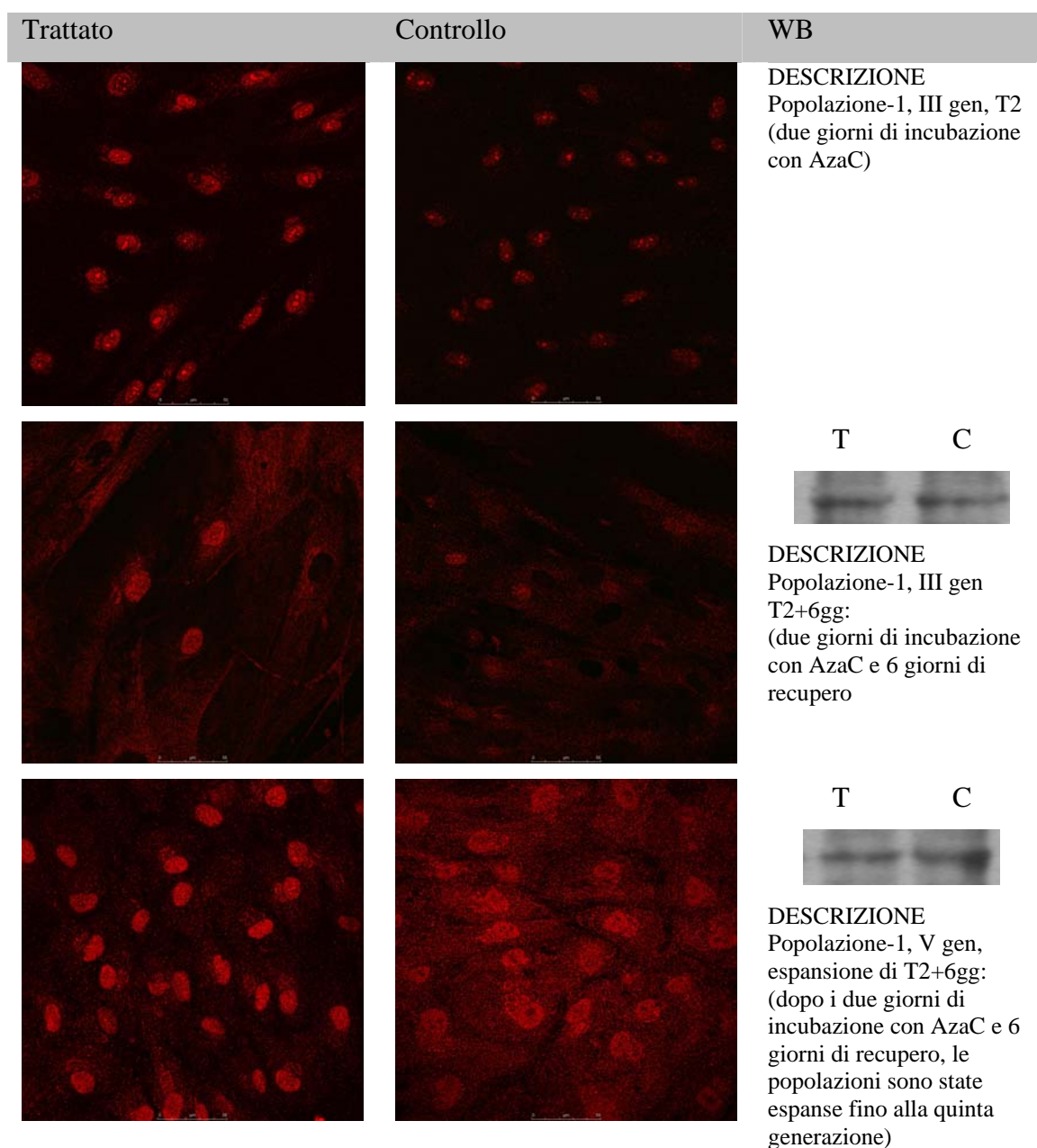


Figura 3.22 Immagini di microscopia confocale della proteina SREBP, dopo due giorni di trattamento demetilante. Il marcatore è presente a livello citoplasmatico e nucleare; la sua espressione non è influenzata dal trattamento demetilante. A fianco, le bande visualizzate con WB in corrispondenza del peso molecolare 125Kd, dello SREBP.

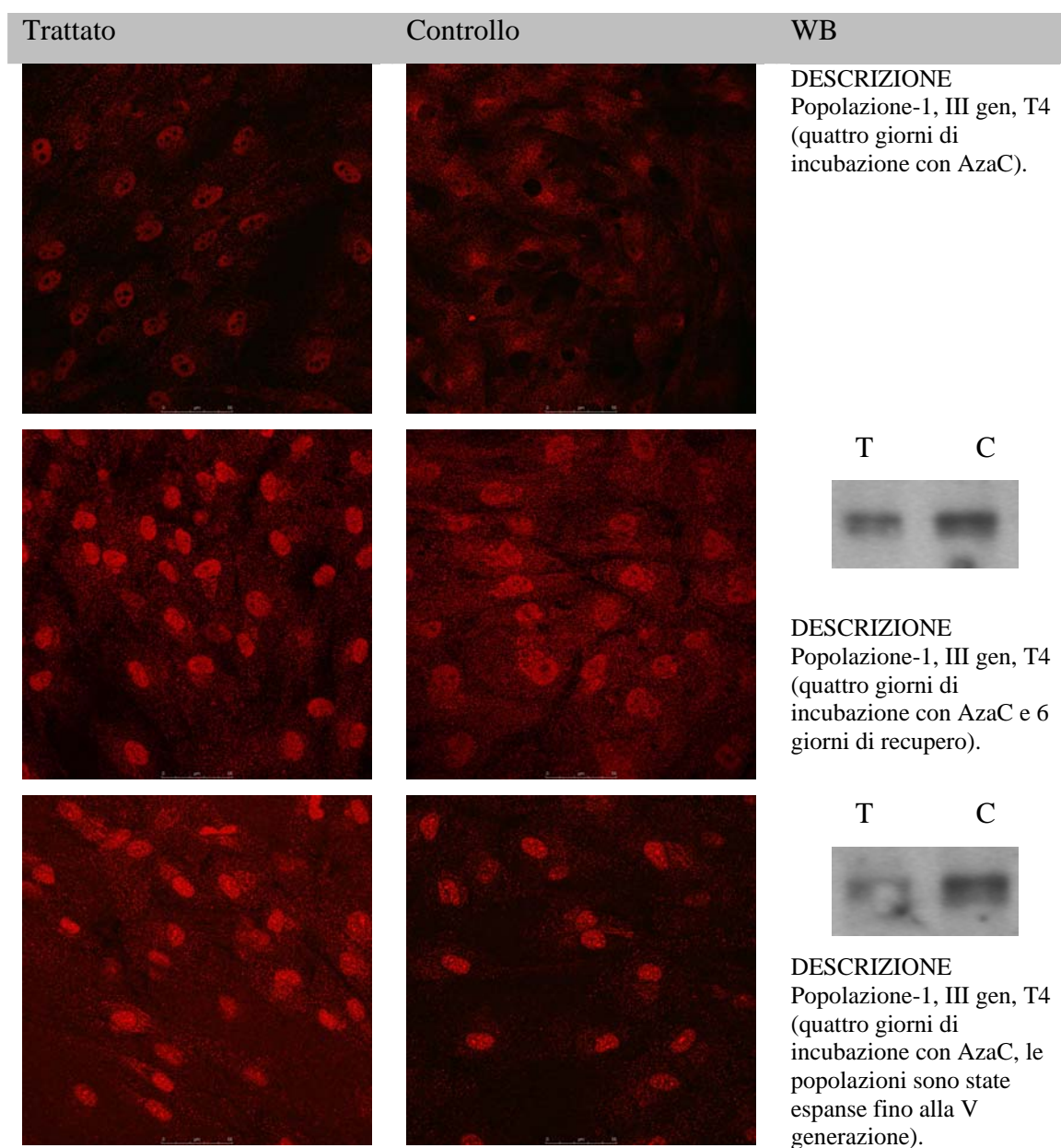


Figura 3.23 Immagini di microscopia confocale della proteina SREBP dopo 4 giorni di trattamento demetilante. Al tempo T4, nel campione del trattato è stato registrato un segnale nucleare più forte rispetto al campione di controllo; tale differenza non è stata mantenuta nel tempo di analisi successivo. A fianco, le bande visualizzate con WB in corrispondenza del peso molecolare 125kD dello SREBP.

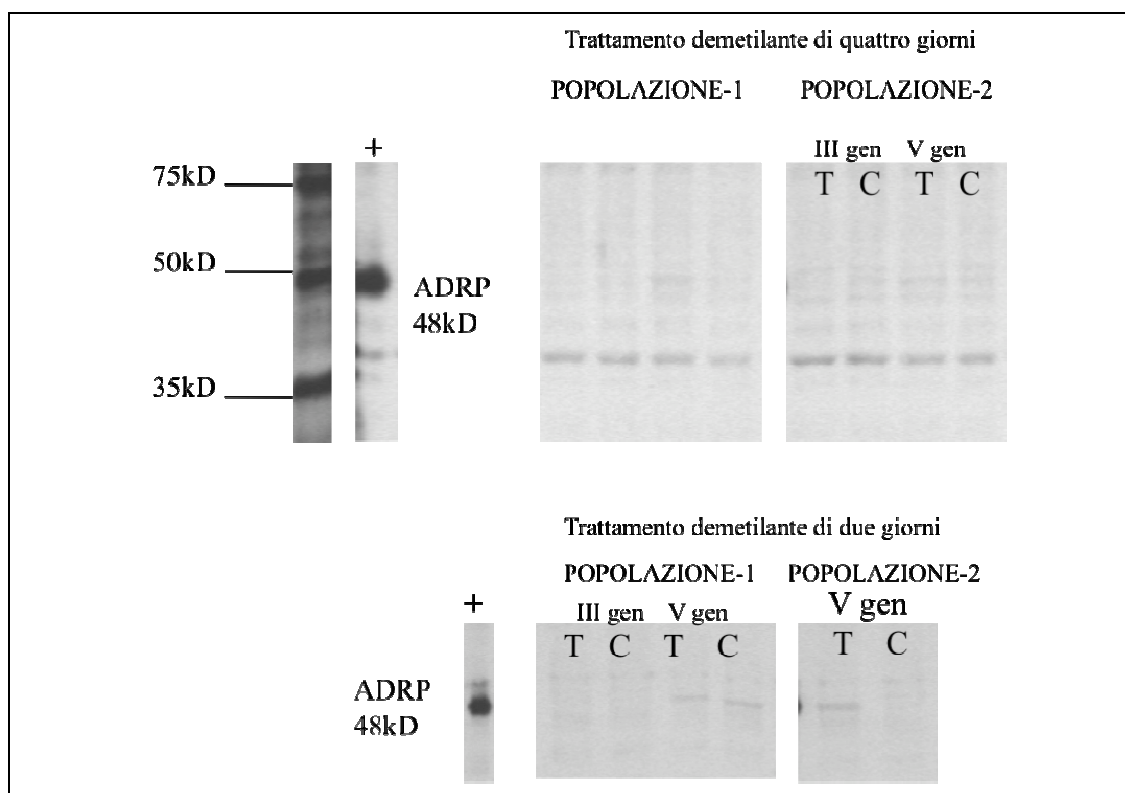


Figura 3.24 Risultati di WB relativi all'ADRP nelle due popolazioni, in seguito al trattamento con 5-Azacidina 10uM per 2giorni (in basso) e 4giorni (in alto). I risultati confermano la mancanza di cellule ADRP+ nei campioni. Solo nel trattato della popolazione-2 di VII generazione, si riscontra una banda in corrispondenza del peso molecolare di 48kD, e che risulta assente nel controllo; la banda, però, confrontata con il segnale del controllo positivo, ottenuto per lisi cellulare della I generazione della popolazione-1, e caricato con lo stesso criterio quantitativo, appare notevolmente poco rappresentativa del contenuto proteico.

Nella valutazione complessiva, questi risultati fanno pensare che il trattamento demetilante di 4 giorni, seguito dal periodo di recupero in terreno proliferativo classico (DMEM-LG, 10%FBS, 1%APS), non sia in grado da solo di modificare l'assetto proteico di una popolazione PLA di terza generazione. Nemmeno l'espansione cellulare, che potrebbe lasciare spazio alla proliferazione di cellule fenotipicamente diverse, ha dato risultati incoraggianti sul de-metilazione indotta dalla 5-Azacidina 10uM.

4. CONCLUSIONI

Le cellule isolate mediante digestione enzimatica di tessuto adiposo umano, ottenuto per liposuzione del grasso omentale, sono ampiamente conosciute nell'ambito della ricerca sulle cellule staminali come *processed lipoaspirate (PLA) cells*. Sebbene la popolazione isolata da tessuto adiposo sia eterogenea per la presenza di cellule endoteliali, cellule ematopoietiche e precursori dell'adipocita nei diversi stadi di differenziamento, le cellule PLA utilizzate nel presente studio circa l'effetto dell'agente demetilante mostrano un'analogia fenotipica con le cellule staminali mesenchimali da midollo osseo in quanto esprimono marcatori di staminalità mesenchimale quali CD105, CD29, CD34, CD44, CD90. A queste caratteristiche immunofenotipiche delle *PLA cells* si associa una capacità differenziativa multipotenziale che conferisce alle cellule estratte da tessuto adiposo interessanti caratteristiche di impiego nella medicina rigenerativa concorrenziali alle staminali embrionali.

Il grado di manipolazione funzionale a cui queste cellule possono giungere è stato studiato in questa ricerca sottoponendo le *PLA cells* ad un trattamento demetilante. Lo stato di metilazione del DNA è oggetto di ricerca nel campo della riprogrammazione genetica, e quindi funzionale, perché la metilazione differenziale di specifici *patterns* genomici rappresenta un passaggio indispensabile per la progressione differenziativa in diversi lignaggi cellulari. E quindi un processo di demetilazione, selettivo e controllato, potrebbe essere uno strumento utile per recuperare a carico di cellule somatiche una condizione epigenetica assimilabile a quella pluripotente embrionale. Un target cellulare importante sul quale valutare l'impatto di questo trattamento potrebbe essere rappresentato da cellule staminali, multipotenti da tessuto adulto le quali sono potenzialmente dotate di una struttura genomica in via di assestamento funzionale quali le *PLA cells*. Per valutare l'impatto della demetilazione su queste cellule è stato scelto la 5-Azacidina, un analogo nucleotidico che agisce da inibitore dell'enzima DNMTn dopo essere stato intercalato nel DNA della cellula proliferativi, conosciuto per la sua capacità, a concentrazioni micromolari, di alterare l'espressione proteica di marcatori tessuto-specifici o fattori di staminalità. Il lavoro condotto sulle *PLA cells* aveva lo scopo di analizzare gli effetti del trattamento demetilante su un modello cellulare di derivazione umana; l'analisi ha riguardato le caratteristiche morfologiche e fenotipiche, l'attività

metabolica e la capacità differenziativa delle cellule dopo trattamento con l'agente demetilante.

I risultati preliminari ottenuti hanno evidenziato che il trattamento con 5-Azacidina 1 e 10 M per un periodo di incubazione di quattro giorni causa una riduzione dell'attività metabolica delle deidrogenasi mitocondriali, rispetto alla popolazione non trattata. Il test condotto emerge che la vitalità cellulare è influenzata negativamente nelle 24-72 ore successive all'inizio del trattamento con 5-Azacidina alle concentrazioni 1 e 10uM. Il saggio con BrdU, intercalante timidinico, non ha rilevato conseguenze negative per il trattamento con 5-Azacidina sulla proliferazione delle cellule trattate, che invece, hanno mostrato capacità replicativa paragonabile alle popolazioni di controllo. Sembra, quindi, che l'Azacidina non produca una sensibile tossicità mantenendo intatta il profilo proliferativo; a conferma è stato svolto un unico test di apoptosi che è risultato negativo (dato non illustrato). Il trattamento demetilante sembra, invece, aver indebolito l'espansione generazionale delle *PLA cells*: confrontando le conte delle cellule presenti ad ogni passaggio successivo al trattamento, e rispetto al controllo, si ottengono due curve separate; le popolazioni cellulari precedentemente trattate con l'agente demetilante hanno dimostrato di essere sensibili al passaggio generazionale. Questo dato unito all'inalterata capacità proliferativa, precedente alla demetilazione, fa pensare che il trattamento abbia indebolito l'adesione cellulare e indirettamente ridotto il numero di cellule proliferative. L'ipotesi di una alterata capacità di adesione presenta l'ipotesi verso popolazioni potenzialmente neoplastiche (non valutata in questo studio).

La valutazione morfologica su cellule di Ia generazione mediante microscopia ottica a contrasto di fase non ha evidenziato differenze tra controllo e trattato nella distribuzione cellulare e nella complessità citoplasmatica. L'analisi con microscopia a scansione elettronica ha confermato un'analogia dimensionale. Queste indagini non sono comunque in grado di svelare aspetti più fini di eventuali differenze tra *PLA cells* trattate e non trattate. Altri aspetti morfologici appaiono, viceversa, di un certo interesse come per es. la presenza di vescicole citoplasmatiche sensibili al trattamento disidratante. Le cellule isolate da tessuto adiposo per digestione enzimatica, *committed* in senso adipogenico, contengono nel citoplasma vescicole di accumulo, evidenziate con colorazione ORO specifica per i lipidi neutri. Il mantenimento di queste cellule in coltura e l'espansione generazionale causano una diminuzione della quota cellulare positiva alla

colorazione ORO e una riduzione dei vacuoli lipidici. Questo segnale di de-differenziamento è stato osservato anche con un metodo indiretto di misura dell'attività lipolitica delle lipasi (LPL). La valutazione quantitativa del glicerolo extracellulare secreto dalle cellule nel terreno di coltura ha dimostrato un innalzamento della sua concentrazione in seguito all'aggiunta nel terreno dei fattori differenziativi adipogenici. Il confronto tra trattato e controllo in merito alla concentrazione extracellulare di glicerolo non ha evidenziato variazioni indotte dal trattamento demetilante, sia nel periodo di coltura proliferativa sia durante il differenziamento adipogenico. I dati di citochimica, relative alla distribuzione delle vescicole citoplasmatiche, e i valori spettrometrici del glicerolo secreto a livello extracellulare, consentono di affermare che le cellule trattate con 5-Azacidina rispondono in modo paragonabile al controllo, ai fattori differenziativi adipogenici.

Le *PLA cells* sono state indotte al differenziamento in senso adipogenico ed osteogenico per valutare eventuali effetti citochimici del trattamento demetilante sulla capacità delle cellule trattate di rispondere agli stimoli differenziativi. I risultati ottenuti non hanno evidenziato effetti del trattamento demetilante sulla capacità di differenziamento rispetto ai campioni non trattati prima dell'induzione con fattori differenzianti.

In considerazione della capacità della 5-Azacidina di modificare l'espressione di marcatori somatici e di fattori staminali, sono stati valutati marcatori tessuto-specifici e fattori di trascrizione embrionali su popolazioni cellulari in differenti stadi generazionali. E' stato già osservato che la popolazione di partenza presenta un fenotipo eterogeneo e l'analisi immunofenotipica mediante citofluorimetria ha evidenziato nella III generazione un arricchimento nella componente CD90+/CD105+/CD29+, rispetto alla popolazione analizzata subito dopo l'isolamento dal tessuto adiposo. Le cellule di terza generazione mostrano differenze anche riguardo ai marcatori tessuto-specifici: scompare il segnale dell'ADRP, assieme alla positività alla colorazione ORO, mentre lo SREBP1 è ugualmente espresso.

Nella popolazione di quarta generazione è stato rilevato il segnale del marcatore STRO1, specifico delle cellule staminali mesenchimali estratte da midollo osseo. Questo risultato, abbinato alla scomparsa dei vacuoli lipidici e del segnale dell'ADRP, può essere interpretato come effetto di un processo de-differenziativo indotto dal mantenimento in coltura per più passaggi generazionali. E' stato anche osservato che

l'espansione prolungata (più di tre settimane di coltura) di una popolazione di *PLA cells* può portare a invecchiamento o differenziamento, con la perdita dei requisiti che identificano la cellula adiposa, quali perdita dello spessore e dei contorni cellulari, e sofferenza cellulare.

Per quanto concerne l'effetto del trattamento demetilante sui marcatori CD105, ADRP, SREBP, STRO1, NANOG e OCT4 e l'espressione dei fattori di trascrizione embrionali NANOG e OCT4 i risultati ottenuti con il trattamento demetilante della I generazione di *PLA cells*, considerata eterogenea, sono comparabili a quanto osservato negli esperimenti con la popolazione arricchita nella componente cellulare CD105+/CD29+/CD90+/ADRP-, di III-IV generazione. La visualizzazione mediante microscopia confocale dell'espressione dei marcatori non ha evidenziato alcuna variazione nella presenza/assenza del segnale tra i campioni cellulari trattati con 5-Azacidina e i controlli. Popolazioni di cellule di III e IV generazione sono stati monitorati in tempi successivi al trattamento demetilante, per valutare la presenza di cellule de-differenziate nelle popolazioni invecchiate; il tempo di trattamento di quattro giorni può essere sufficiente a modificare l'attività metabolica della cellula ma non per un cambiamento del profilo proteomico.

I risultati di analisi molecolare ottenuti dalle popolazioni di III e IV generazione dopo trattamento demetilante (T4), periodo di recupero (T4+6) ed espansione generazionale non hanno parimenti fornito risultati conclusivi. Le osservazioni raccolte mediante microscopia confocale a scansione laser mostrano la presenza dello SREBP1 a livello citoplasmatico (come precursore) e nucleare (come fattore di trascrizione) in modo comparabile nel trattato e nel controllo, e ugualmente nei tre tempi di osservazione (T4; T4+6; dopo espansione). L'analisi semiquantitativa mediante Western blotting ha confermato quanto osservato con la LSCM.

L'ADRP, scomparso già durante i passaggi generazionali, non è stato rilevato con l'analisi LSCM in corrispondenza delle condizioni e dei tempi elencati per lo SREBP. L'indagine con Western blotting ha, invece, rilevato una banda di una certa consistenza del peso molecolare dell'ADRP, nella popolazione espansa dopo l'esperimento di demetilazione, nel trattato e nel controllo. Questo risultato si spiega con quanto osservato al di fuori dello schema sperimentale di demetilazione: le cellule ADRP-/ORO- in presenza di fattori induttivi adipogenici rispondono positivamente, con comparsa di vacuoli di colore rosso per la colorazione ORO già dopo 5 giorni dall'induzione al

differenziamento. Quindi, la popolazione ADRP-/ORO- potrebbe conservare una componente *committed* in senso adipogenico, insensibile al trattamento demetilante con 5-Azacidina 10 M.

Nei campioni mantenuti in coltura per il periodo di recupero di 6 giorni, dopo il trattamento demetilante, e nelle popolazioni delle generazioni successive è stato registrato un chiaro segnale positivo allo STRO1, a confermare il dato precedentemente riportato che tempi prolungati di coltura (oltre le tre settimane) possono trasformare la cellula. Questo risultato può essere variabilmente interpretato; la coltura prolungata potrebbe avere provocato un invecchiamento della popolazione facendola regredire perdendo le caratteristiche peculiari a favore dello STRO1, oppure è col mantenimento in coltura, è stata selezionata una cellula de-differenziata con caratteristiche immunofenotipiche diverse dalla cellula di origine.

Infine, il trattamento demetilante non ha indotto l'espressione dei fattori di trascrizione embrionali, NANOG e OCT4.

In conclusione, il trattamento per semplice aggiunta nel terreno di coltura dell'agente demetilante 5-Azacidina, in concentrazione 10 M, non sembra essere sufficiente ad indurre un cambiamento proteomico, con reversione dell'iniziale commitment per il lignaggio cellulare tessuto-specifico. Una spiegazione per questa inerzia funzionale potrebbe essere trovata nella scelta del modello sperimentale: risultati positivi presentati in altre ricerche sono stati ottenuti fino ad ora su cellule di origine animale o cellule stabilizzate; diversamente le cellule usate in questo studio sono cellule differenziate di derivazione umana. La complessa partecipazione dei fattori deputati alla modificazione epigenetica non è ancora del tutto chiarita e la sperimentazione sulla demetilazione potrebbe avere maggior successo con associazione di agenti demetilanti/deacetilanti in combinazione a fattori di crescita specifici per la proliferazione cellulare. Infine, uno studio approfondito del fenomeno di de-differenziamento riscontrato nelle popolazioni mantenute oltre le tre settimane *in vitro*, con comparsa dell'espressione del marcatore di staminalità mesenchimale STRO1, potrebbe fornire delle indicazioni per uno studio mirato alle modifiche avvenute nel corso del processo di reversione ad uno stato di competenza più ampio del profilo cellulare di partenza. Ci si chiede se il comportamento descritto sia da imputare alla miscela di fattori utilizzati per la coltura o sia dovuto ad una risposta spontanea della modello cellulare utilizzato.

BIBLIOGRAFIA

Ailhaud G, Grimaldi P, and Négrel R. «Cellular and molecular aspects of the adipose tissue development.» *Annual Review of Nutrition* 12 (1992): 207-233.

Alberio R, Campbell KH, and Johnson AD. «Reprogramming somatic cells into stem cells.» *Reproduction* 132 (2006): 709-720.

Antequera F, and Bird A. «Number of CpG islands and genes in human and mouse.» *PNAS* 90 (1993): 11995-11999.

Araujo FD, Croteau S, Slack AD, Milutinovic S, Bigey P, Price GB, Zannis-Hajopoulos M, and Szyf M. «The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus.» *The Journal of Biological Chemistry* 276, n. 10 (March 2001): 6930-36.

Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YDC, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, and Gimble JM. «Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates.» *Cytotherapy* 6, n. 1 (2004): 7-14.

Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmot I, Meehan R, and Young L. «Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer.» *Biology of Reproduction* 71 (2004): 185-193.

Boquest AC, Noer A, and Collas P. «Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue.» *Stem Cell Reviews* 2 (2006): 319-329.

Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, Brinchmann JE. «Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture.» *Molecular Biology of the Cell* 16, n. 3 (March 2005): 1131-1141.

Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. «Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein.» *Journal of Lipid Research* 38 (1997): 2249-2263.

Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, and Fisk NM. «fetal blood, liver, and bone marrow Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester.» *Blood* 98, n. 8 (October 2001): 2396-2402.

Chen S, Hilcove S, and Ding S. «Exploring stem cell biology with small molecules.» *Molecular BioSystems* 2 (2006): 18-24.

Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, and Ding S. «Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule.» *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004): 410-411.

Christman JK. «5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy.» *Oncogene* 21 (2002): 5483-95.

Constantinides PG, Taylor SM, and Jones PA. «Phenotypic conversion of cultured mouse embryo cells by aza pyrimidine nucleosides.» *Developmental Biology* 66 (1978): 57-71.

Cristofalo VJ, Allen RG, Pignolo RJ, Martin BG, and Beck GC. «Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation.» *PNAS* 95 (September 1998): 10615-10619.

Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, and Tuan RS. «Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes.» *Stem Cells* 24 (2006): 1487-1495.

Devereux TR, Horikawa I, Colleen HA, Annab LA, Afshari CA, and Barret JC. «DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene.» *Cancer Research* 59 (December 1999): 6087-6090.

Eilertsen KJ, Power RA, Harkins, LL, and Misica P. «Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer.» *Animal Reproduction Science* 98 (2007): 129-146.

Feldmann RE Jr, Bieback K, Maurer MH, Kalenka A, Bürgers HF, Gross B, Hunzinger C, Klüter H, Kuschinsky W, Eichler H. Electrophoresis. «Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood.» *Electrophoresis* 26, n. 14 (July 2005): 2749-58.

Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA and Coppack SW. «Integrative physiology of human adipose tissue.» *International Journal of Obesity* 27 (2003): 875-888.

Freitas CS, and Dalmau SR. «Multiple sources of non-embryonic multipotent stem cells: processed lipoaspirates and dermis as promising alternatives to bone-marrow-derived cell therapies.» *Cell and Tissue Research* 325 (2006): 403-411.

Gabbara S, and Bhagwa AS. «The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor.» *Biochemical Journal* 307 (1995): 87-92.

Gomillion CT, Burg KJL. «Stem cells and adipose tissue engineering.» *Biomaterials* 27 (2006): 6052-6063.

Green H, and Kehinde O. «An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factor affecting the adipose conversion» *Cell* 5 n.1 (1975):19-27.

Gregoire FM, Smas CM and Sul HS. «Understanding Adipocyte Differentiation.» *Physiological Reviews* 78, n. 3 (July 1998): 783-809.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW and Gimble JM. «Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells.» *Journal of Cellular Physiology* 189 (2001): 54-63.

Guo Y, Engelhardt M, Wider D, Abdelkarim M and Lübbert M. «Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on proliferation, differentiation and p15/INK4b regulation of human hematopoietic progenitor cells.» *Leukemia* 20 (2006): 115-121.

Haaf T, and Schmid M. «Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes.» *Cytogenetics and Cell Genetics* 91 (2000): 113-123.

Hauner H, Entenmann G. «Regional variation of adipose tissue differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women.» *International Journal of Obesity* 15 (1991): 121-26.

Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR and Keenan TW. «Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases.» *Cell and Tissue Research* 294, n. 2 (October 1998): 309-321.

Heid HW, Schnolzer M and Keenan TW. «Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane.» *Journal of Biochemistry* 320 (1996): 1025-130.

Hochedlinger K, and Jaenisch R. «Nuclear reprogramming and pluripotency.» *Nature* 441 (2006): 1061-1067.

Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR and Pittenger MF. «Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is

regulated by mitogen-activated protein kinase.» *Journal of Biological Chemistry* 275, n. 13 (March 2000): 9645-52.

James SR, Link PA, Karpf AR. «Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline antigen genes by DNMT1 and DNMT3b.» *Oncogene* 25 (2006): 6975-85.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. «Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.» *Stem Cells* 24 (2006): 1294-1301.

Kono T. «Nuclear transfer and reprogramming.» *Reviews of Reproduction* 2 (1997): 74-80.

Kumar BM, Jin HF, Kim JG, Song HJ, Hong Y, Balasubramanian S, Choe SY, and Rho GJ. «DNA methylaiton levels in porcine fetal fibroblasts induced by an inhibitor of methylation, 5-Azacitidina.» *Cell and Tissue Research* 325 (2006): 445-454.

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. «Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue.» *Cellular Physiology and Biochemistry* 14 (2004): 311-324.

Li LH, Olin EJ, Fraser TJ, and Bhuyan BK. «Phase specificity of 5-Azacytidine against mammalian cells in tissue culture.» *Cancer Research* 30 (November 1970): 2770-2775.

Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, and Tian W. «Molecular and cellular characterization during chondro- genic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo.» *J. Cell. Mol. Med. Vol* 9, n. 4 (2005): 929-939.

Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, and Hochedlinger K. «Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.» *Cell Stem Cell* 1 (July 2007): 55-70.

Mann MRW, and Bartolomei MS. «Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones.» *Genome Biology* 3, n. 2 (2002): 1003.1-1003.4.

Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukada N, Iribe Y, Yanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, and Mughishima H. «Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential physiology physiology.» *Journal of Cellular Physiology*. 215 (2008): 210-222.

Mick GJ, Wang X, and McCormick K. «White adipocyte vascular endothelial growth factor regulation by insulin.» *Endocrinology* 143, n. 3 (2002): 948-953.

Miner J. «The adipocyte as an endocrine cell.» *Journal of Animal Science* 82 (2004): 935-941.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garretta S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. «Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers.» *Stem Cells* 24 (2006): 376-385.

Mizuno H, and Hyakusoku H. «Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells.» *Journal of Nippon Medical School* 70, n. 4 (2003): 300-306.

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, and Hedrick MH. «Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells.» *Plastic Reconstructive Surgery* 109 (2002): 199-209.

Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, and Reik W. «Epigenetic reprogramming in mammals.» *Human Molecular Genetics* 14, n. 1 (2005): R47-R58.

Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, Favrot M, and Benhamou PY. «Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro.» *Stem Cells* 2005 223 (2005): 594-640.

Murakami T, Li X, Gong J, Bhatia U, Traganos F, and Darzynkiewicz Z. «Induction of apoptosis by 5-azacytidine: drug concentration-dependent differences in cell cycle specificity.» *Cancer Research* 55 (July 1995): 3093-3098.

Okita K, Ichisaka T, and Yamanaka S. «Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells .» 448 (July 2007): 313-318.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. «Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.» *Science* 284 (1999): 143-147.

Poirer F, Bourin P, Bladier D, Joubert-Carin R, and Caron M. «Effect of 5-azacytidine and galectin-I on growth and differentiation of the human b lymphoma cell line b136.» *Cancer Cell International* 1 (2001).

Reik W. «Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development.» *Nature* 447, n. 7143 (May 2007): 425-432.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, and Bongso A. «Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.» *Nature Biotechnology* 18 (2000): 399-404.

Roche E, Jones J, Arribas MI, Leon-Quinto T, and Soria B. «Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells.» *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14 (2006): 6466-6474.

Sakashita K, Koike K, Kinoshita T, Shiohara M, Kamijo T, Taniguchi S, and Kubota T. «Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development.» *Current Biology* 7 (1997): R305-307.

Sengenés C, Lolméde K, Zakaroff-Girard A, Busse R and Bouloumié A. «Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells.» *Journal fo Cellular Physiology* 205 (2005): 114-122.

Shimano H. «Sterol regulatory element-binding proteins(SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes.» *Progress in Lipid Research* 40 (2001): 439-452.

Siegfried Z, and Cedar H. «DNA methylation: a molecular lock.» *Current Biology* 7 (1997): R305-307.

Simmons PJ, and Torok-Storb B. «Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO1.» *Blood* 78, n. 1 (July 1991): 55-62.

Steiner S, Wahl D, Mangold BL, Robinson R, Raymarkers J, MeheusL, Anderson NL and Corder A. «Induction of adipose differentiation-related protein in liver of etomoxir-treated rats.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218 (1996): 777-782.

Stojkovic M, Lako M, Strachan T and Murdoch A. «Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells.» *Reproduction* 128 (2004): 259-267.

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. «Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.» *Current Biology* 11 (2001): 1553-1558.

Takahashi K, and Yamanaka S. «Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.» *Cell* 126 (2006): 663-676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S. «Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.» *Cell* 131 (November 2007): 861-72.

Taylor SM, and Jones PA. «Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-Azacytidine.» *Cell* 17 (1979): 771-779.

Trounson A. «The production and directed differentiation of human embryonic stem cells.» *Endocrine Reviews* 27 (2): 208-219 27, n. 2 (April 2006): 208-219.

Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y, Otani T, Motoda R, Nakamura S, and Orita K. «Demethylating agent, 5-azacytidine, reverses differentiation of embryonic stem cells.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, n. 1 (October 2004): 86-90.

Tsumura A, Hayakawa T, Yuichi Kumaki Y, Takebayashi SI, Sakaue M, Matsuoka C, Shimotohno K, Ueda HR, Nakayama JI, and Okano M. «Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b.» *Genes to Cells* 11 (2006): 805-814.

Wagers AJ, and Weissman IL. «Plasticity of adult stem cells.» *Cell* 116 (March 2004): 639-648.

Weber K, and Osborn M. «The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.» *The Journal of Biological Chemistry* 244, n. 16 (August 1969): 4406-4412.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, and Campbell KH. «Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.» *Nature* 385 (1997): 810-813.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P and Hedrick MH. «Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells.» *Molecular Biology of the Cell* 13 (December 2002): 4279-4295.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. «Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.» *Tissue Engineering* 7, n. 2 (April 2001): 211-28.