

IGM CNR
ICH HUMANITAS

SUPERPIG

LE CELLULE iPS

Sottoprogetto 3: Medicina Rigenerativa

Questo sottoprogetto si propone di sviluppare approcci innovativi che, partendo da cellule dell'organismo adulto, consentano la produzione di cellule differenziate pertinenti a tessuti specifici quali quelli ematopoietici e cardiaci. Queste cellule, ottenute mediante tecnologie di riprogrammazione (cellule iPS) con successiva differenziazione, oppure differenziate da specifiche popolazioni staminali già presenti nell'organismo adulto (es. emangioblasta), possono fornire alla comunità scientifica una base fondamentale per lo sviluppo di tecnologie di medicina rigenerativa nel modello suino che è in grado di riprodurre in maniera più realistica aspetti di fisiologia umana che il modello murino non è in grado di assicurare. Tale ricerca si avvarrà anche della collaborazione con un'unità di ricerca che ha sviluppato tecnologie specifiche per l'identificazione in vivo di cellule fluorescenti.

Sottoprogetto 3: Medicina Rigenerativa

- **Sotto-Obiettivi:**
- utilizzazione di vettori virali eliminabili per riprogrammare fibroblasti di maiale e ottenere iPS (P2)
- differenziamento delle iPS verso le cellule del sistema ematopoietico (P2)
- differenziamento di cellule staminali ematopoietiche suine verso cellule della linea eritroide ed endoteliale (P6)
- generazione di cardiomiociti derivati da iPS: definizione di metodi di differenziamento e analisi funzionale in vivo in modelli insufficienza cardiaca cronica (P6)
- biopsia ottica per saggiare la presenza (engrafting) delle cellule trapiantate (P7)

S.O. 3.1 – Utilizzazione di vettori virali eliminabili per riprogrammare fibroblasti di maiale e ottenere iPS (Mese 1-24)

Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto la produzione di cellule iPS di topo, mediante l'uso di un unico vettore virale che può essere eliminato successivamente grazie alla tecnologia cre-lox. Le cellule iPS di suino verranno prodotte sfruttando le conoscenze acquisite in quest'ambito. In particolare, pur essendo disponibili nel topo varie metodiche, comprese quelle che riescono ad evitare l'uso di vettori virali, noi utilizzeremo per il lavoro sul suino la strategia basata sull'utilizzo di un unico vettore virale che esprime tre geni contemporaneamente. Infatti, è stata messa a punto l'infezione con unico vettore lentivirale che esprime Oct4, Sox2 e Klf4, seguita, una volta che si sono ottenute le iPS, dall'eliminazione del vettore con il sistema cre-lox. La stessa procedura verrà utilizzata per la produzione di iPS partendo da fibroblasti di maiale. Contemporaneamente le cellule verranno analizzate per l'espressione di Oct4 (e altri geni) endogeno, per la capacità di differenziarsi in vari tipi tissutali in vitro e per la formazione di teratomi nel topo nudo.

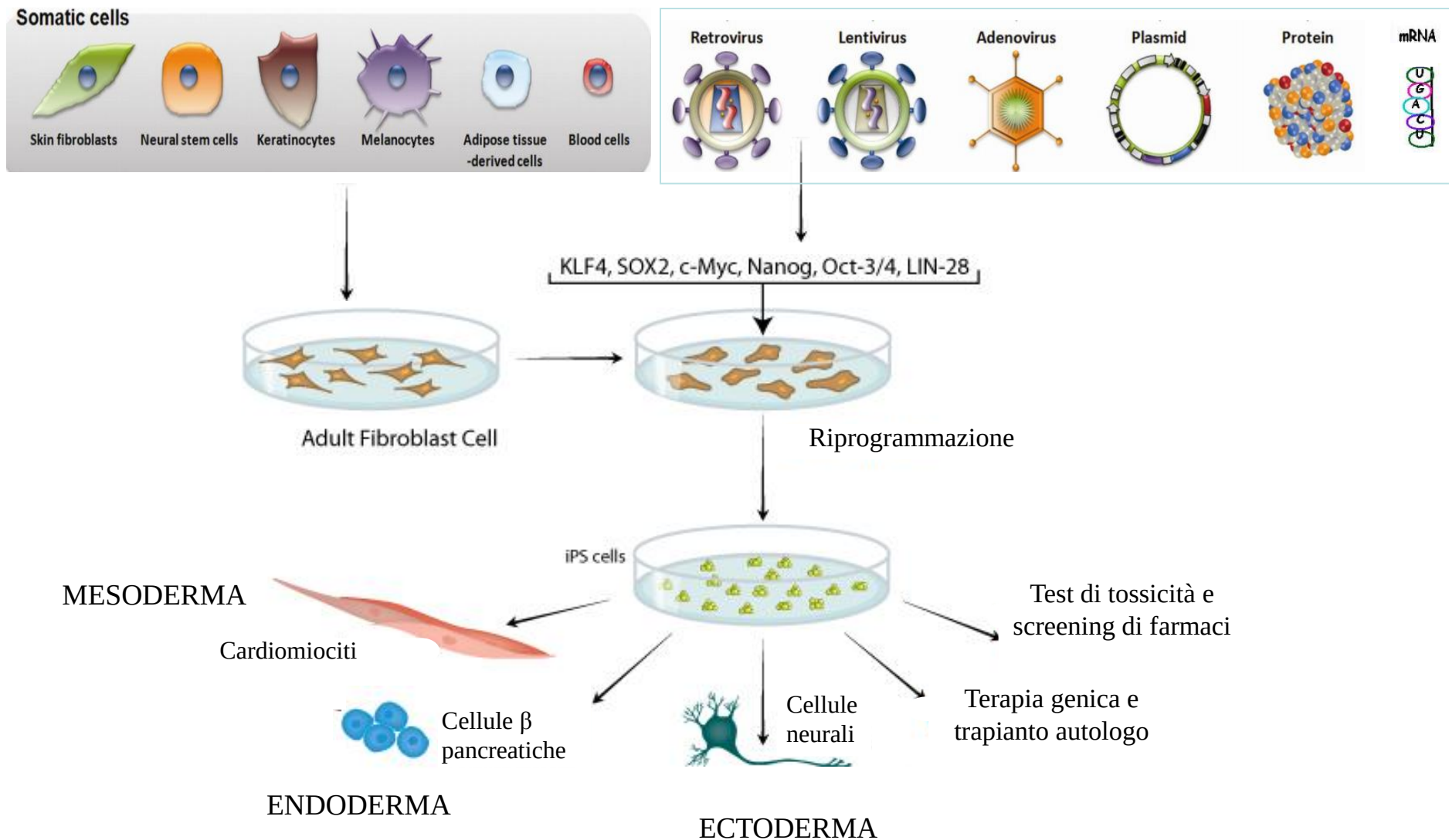
Introduzione alle cellule iPS

Le cellule iPS sono cellule riprogrammate. Durante lo sviluppo embrionale le cellule perdono via via la loro capacità di differenziarsi in tutti i tessuti (pluripotenza) per acquisire le caratteristiche specifiche delle cellule dei singoli tessuti. Si riteneva che questo fosse un processo irreversibile, ma gli esperimenti di clonazione hanno dimostrato che in condizioni molto particolari il recupero dell'originale pluripotenza può essere ottenuto.

La procedura di clonazione è difficile, inefficiente e solleva obiezioni etiche. La recente tecnologia delle iPS messa a punto da ricercatori giapponesi e poi diffusasi in tutta la comunità scientifica tende a superare queste difficoltà, pur non essendo essa stessa scevra di problematiche.

Il razionale delle iPS è illustrato nella figura seguente: le cellule dell'adulto riprogrammate vengono poi indirizzate verso il tessuto di interesse.

Schema per la produzione di cellule pluripotenti indotte (iPSc)

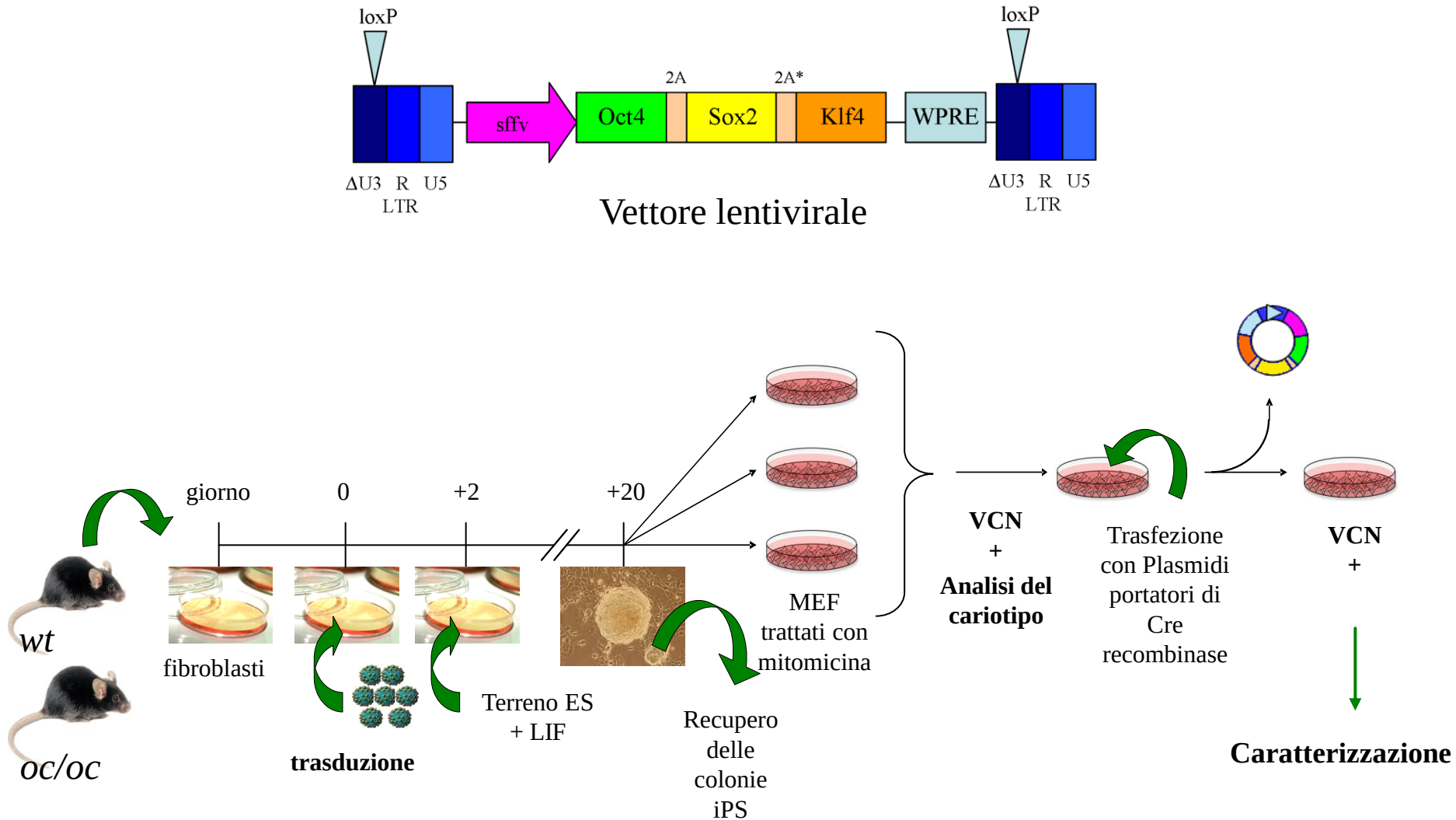


Generazione delle cellule iPS

Le cellule dell'adulto vengono riprogrammate in vario modo. La modalità più diffusa prevede l'utilizzo di 3 o 4 fattori di trascrizione che vengono introdotti nelle cellule somatiche dell'adulto mediante vettori retrovirali. Tuttavia sono state utilizzate altre procedure basate sull'utilizzo di mRNA, miRNA, proteine, transposoni, plasmidi, sostanze chimiche.

Una volta riprogrammate, le cellule vengono controllate per l'acquisizione di pluripotenza e per la stabilità genomica. Nel caso siano stati usati vettori virali, si può procedere alla loro eliminazione mediante l'uso di recombinasi (CRE). Se le cellule derivano da pazienti affetti da malattie genetiche, il difetto può essere corretto. Successivamente le cellule vengono forzate a differenziarsi verso i tessuti desiderati.

Schema riassuntivo della generazione di iPSc



Controllo della pluripotenza

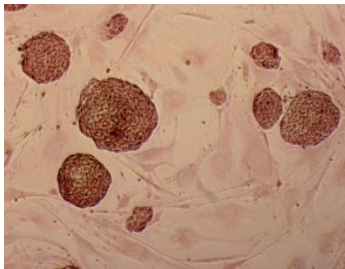
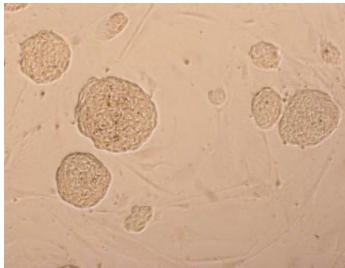
Le colonie di iPS ottenute vengono valutate per la loro pluripotenza, secondo quattro tipi di criteri:

- 1) Espressione di marker di pluripotenza (per Real Time PCR o immunoistochimica)
- 2) Capacità di differenziarsi in vitro nei derivati dei 3 foglietti embrionali
- 3) Formazione di teratomi in vivo
- 4) Iniezione in blastocisti (applicabile nel suino in linea teorica)

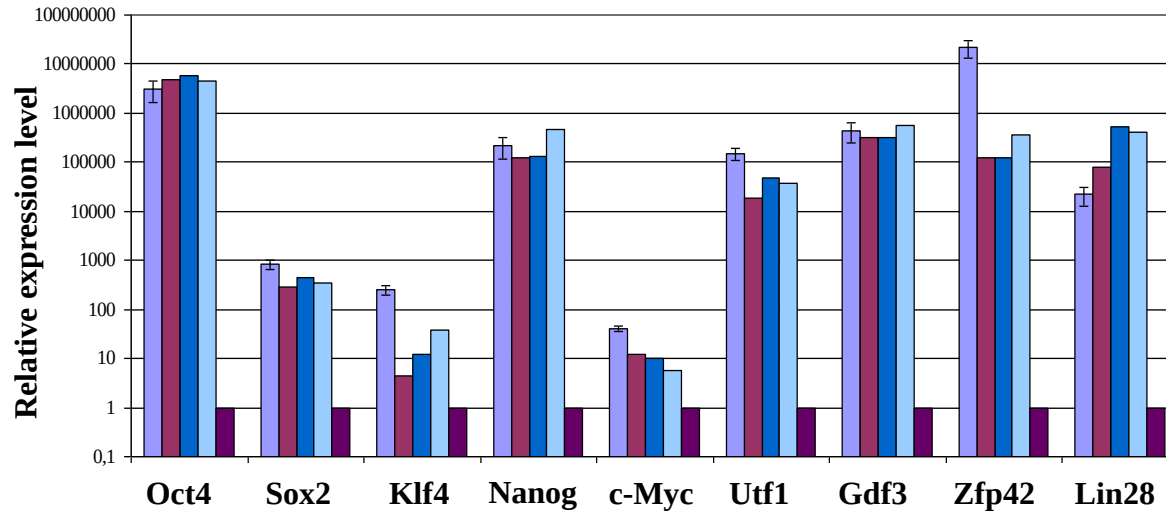
Le due diapo successive mostrano un esempio di questa analisi (criterio 1 e 3)

Controllo della Pluripotenza

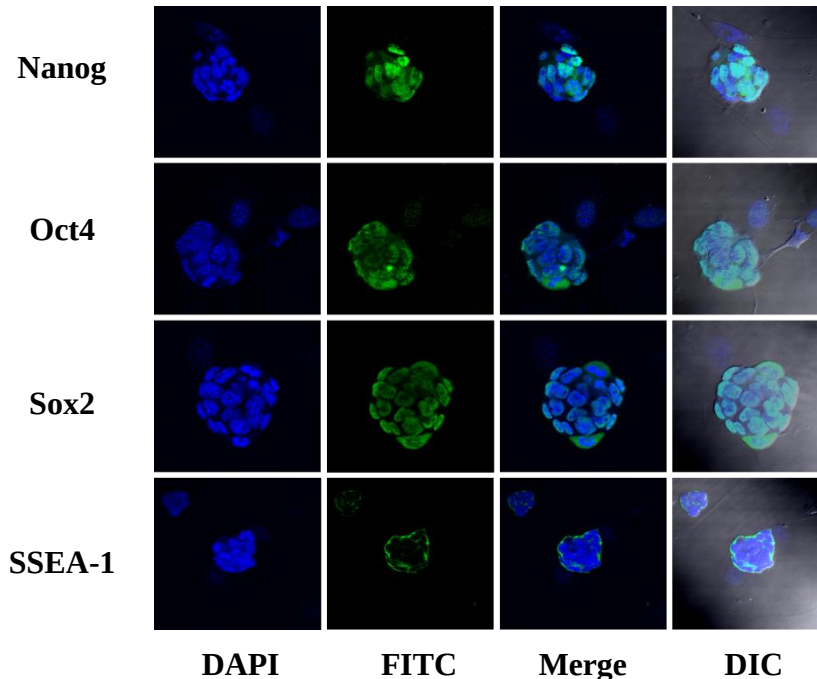
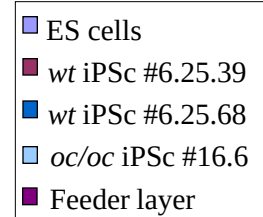
Saggio della Fosfatasi alcalina



4X ingrandimento



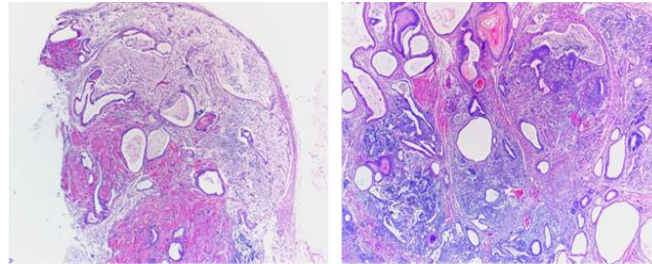
Espressione di geni pluripotenti



Immunocitochimica per marker di staminalità

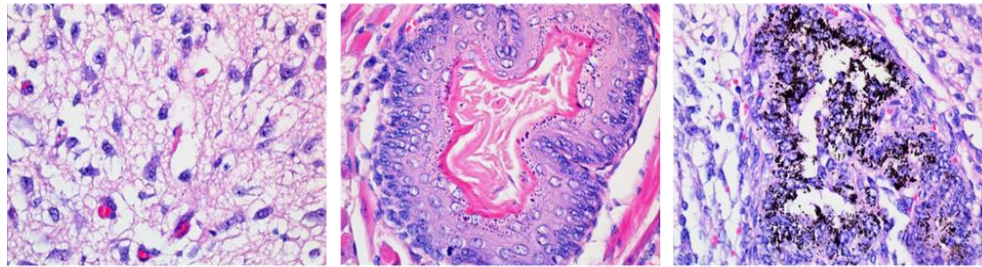
60X ingrandimento

Generazione di teratomi in topi nudi dopo inoculo di iPSc

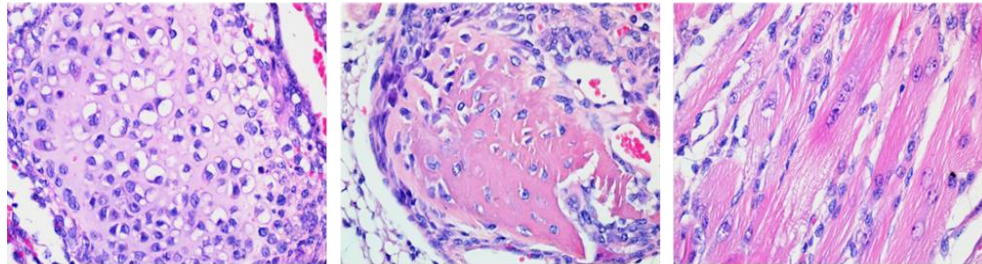


5X ingrandimento

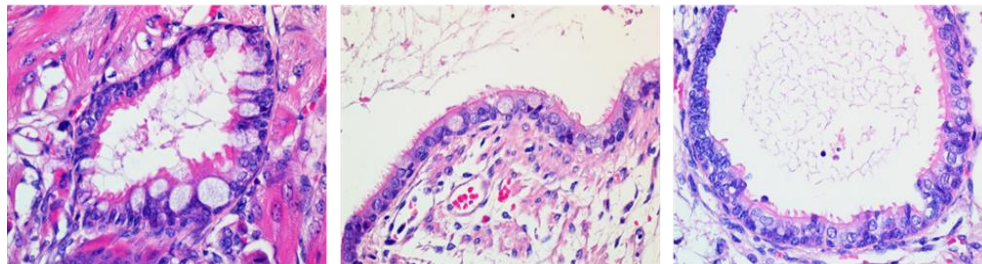
Ectoderma



Mesoderma

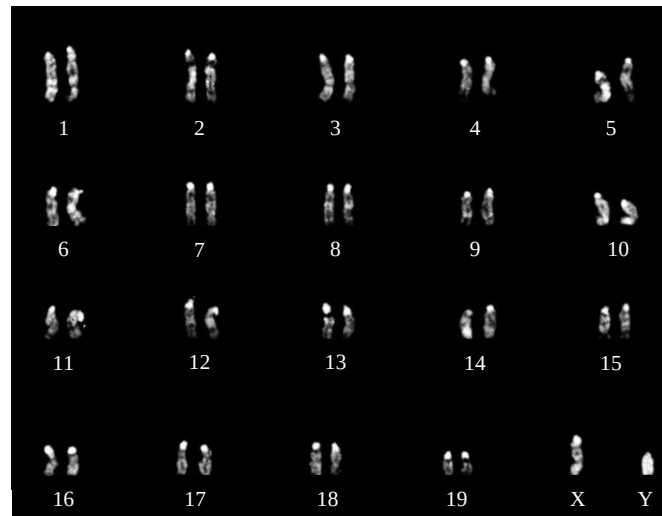
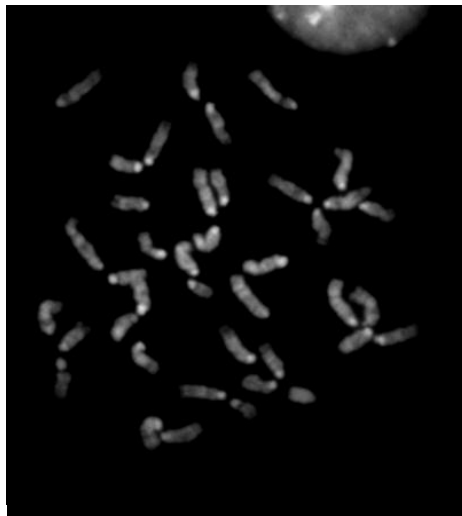
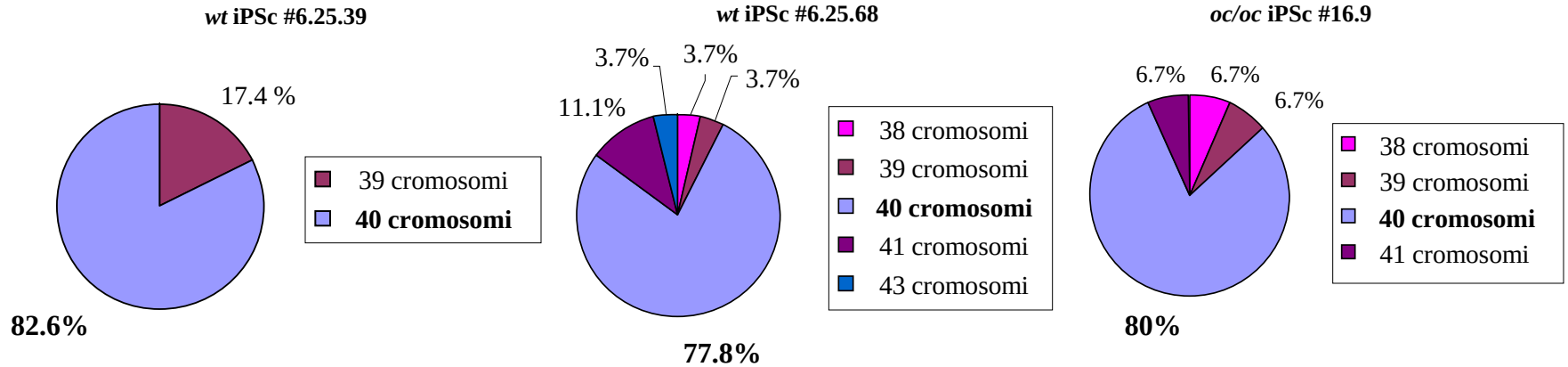


Endoderma



40X ingrandimento

Analisi del cariotipo di cellule iPSc



S.O 3.2 – Differenziamento delle iPS verso le cellule del sistema ematopoietico (Mese 1-24)

(...) Tuttavia, poichè sono già disponibili presso il nostro laboratorio linee iPS di topo, già nei primi mesi del progetto verranno testati su di esse protocolli che consentano la differenziazione verso cellule del sistema ematopoietico e che verranno trasferiti alle linee iPS di suino appena esse saranno disponibili. Come noto, le cellule iPS, per poter essere utilizzate in medicina rigenerativa non possono essere introdotte come tali, ma devono essere forzate a differenziare verso specifiche linee tissutali in relazione alla cellula difettosa nella singola malattia. Nel nostro caso, siamo particolarmente interessati a ottenere cellule differenziate in due particolari tessuti: quello ematopoietico e quello cardiaco.

Il sistema ematopoietico murino

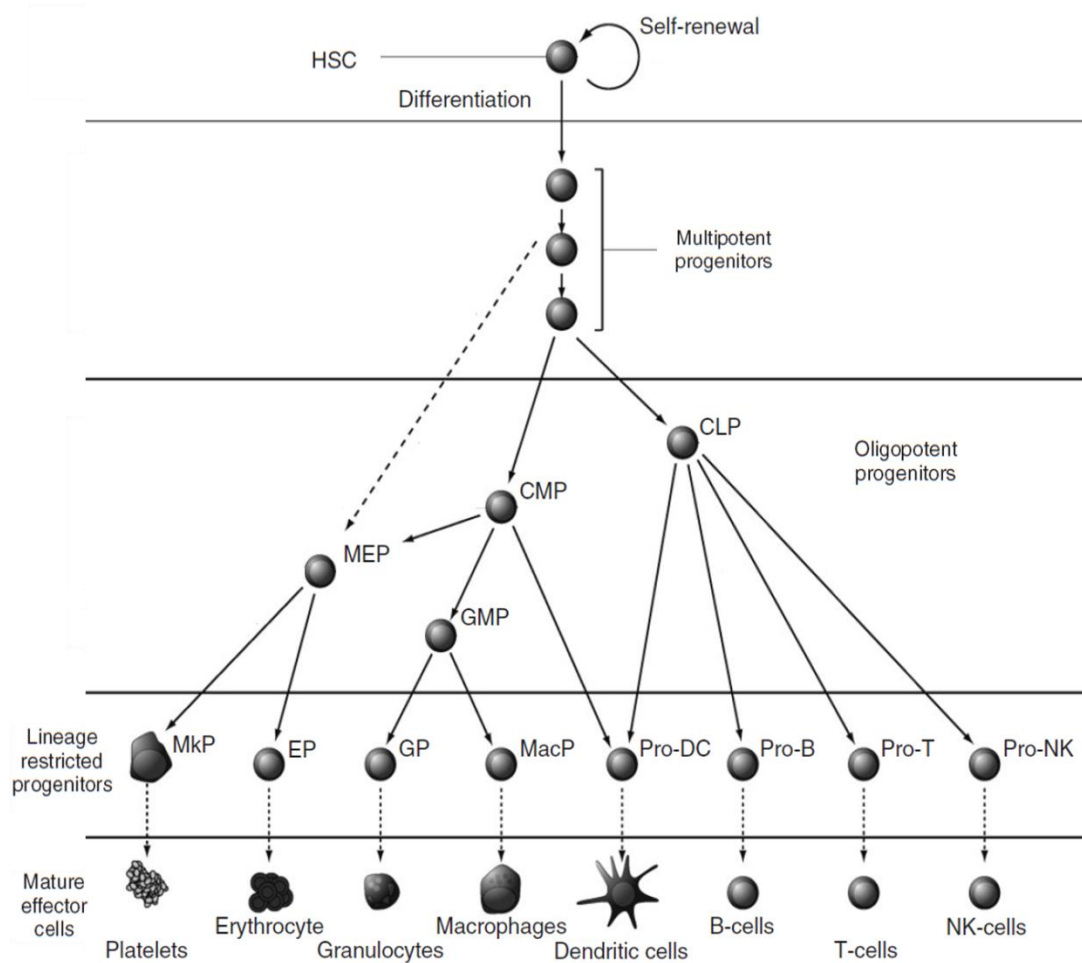


Figure adapted from Seita and Weissman, 2010

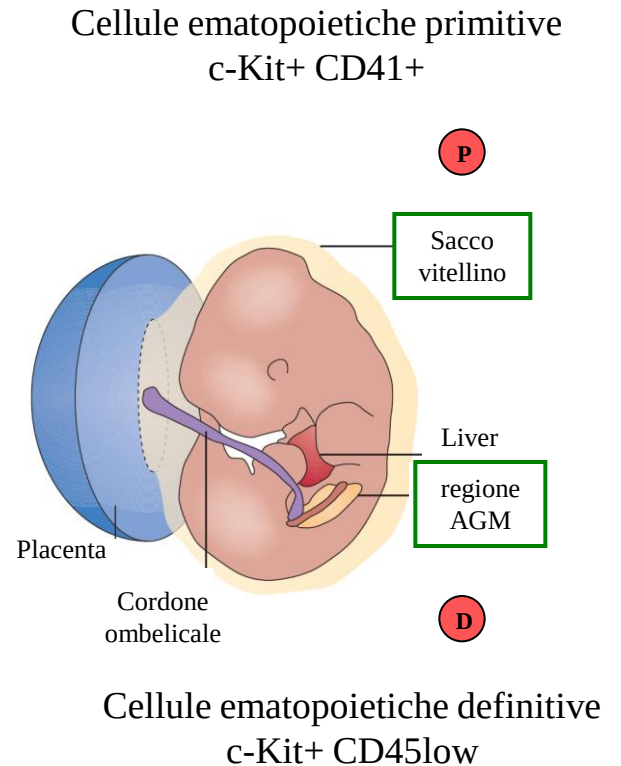
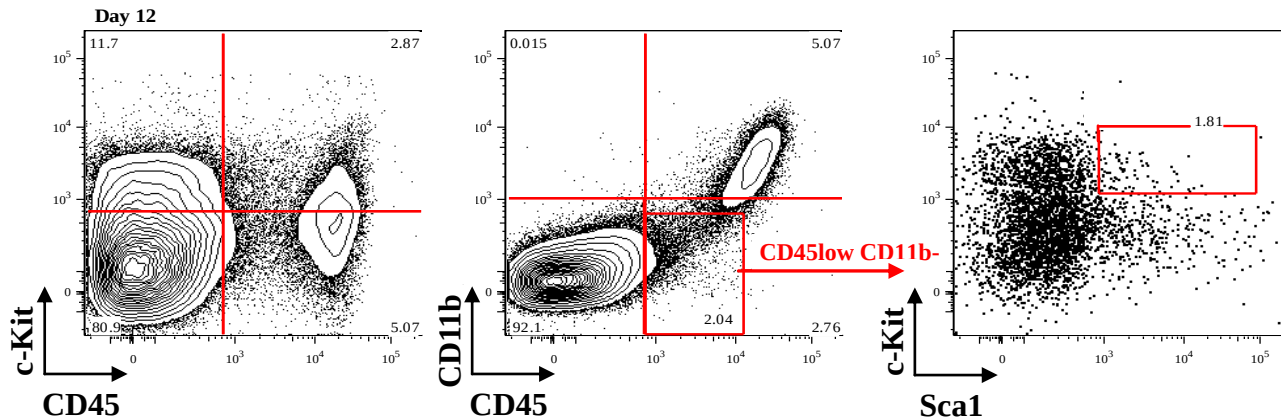
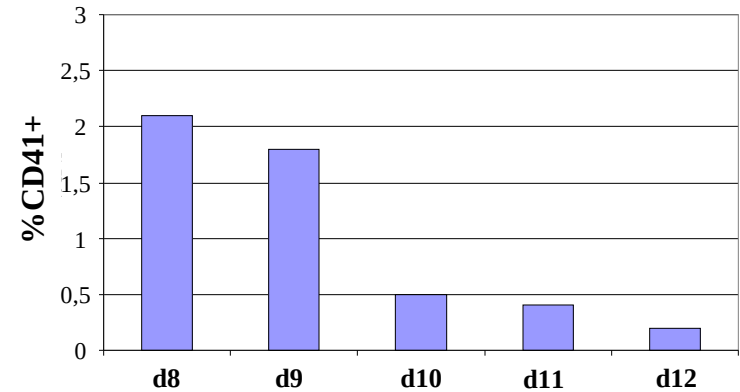
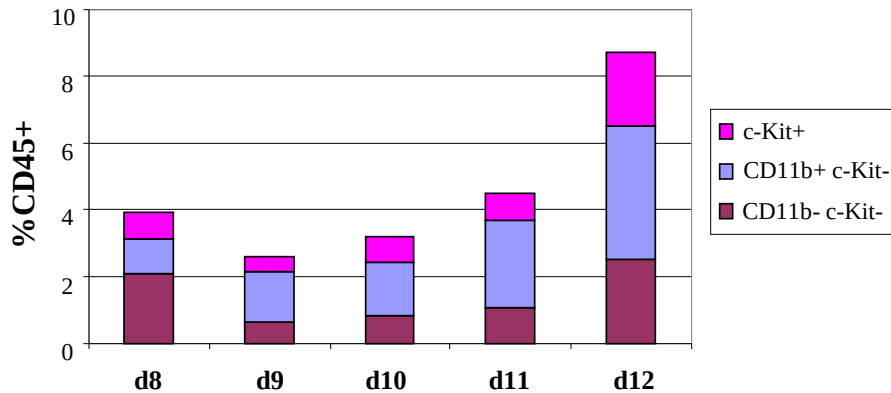


Figure adapted from Medvinsky et al, 2011

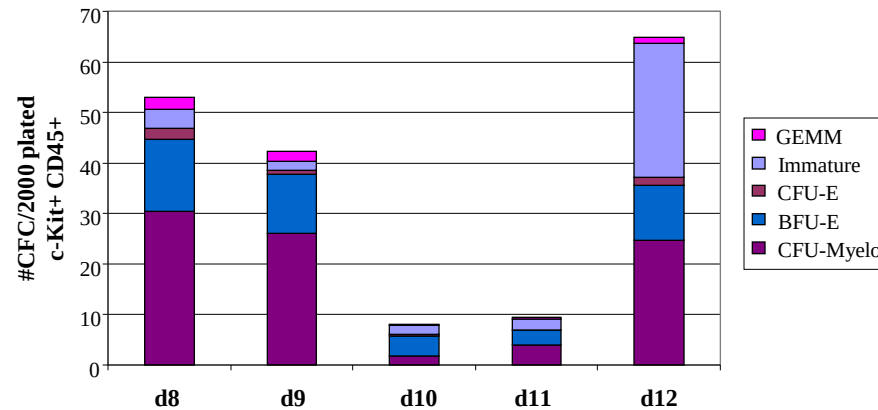
Cellule iPSc si differenziano in cellule ematopoietiche



- * Presenza di cellule CD45+ ematopoietiche
- * Presenza di cellule mieloidi CD11b
- * Presenza di progenitori immaturi CD45^{low} c-Kit⁺

Le cellule iPSc danno origine a colonie ematopoietiche

Dalla frazione
c-Kit+

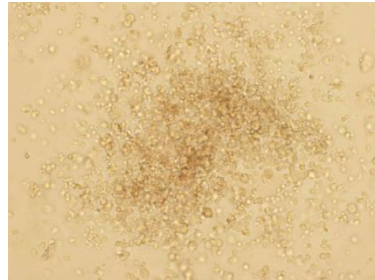


4X ingrandimento



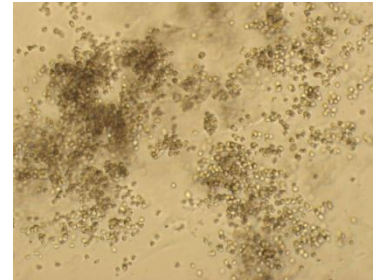
Colonia Monocitica

10X ingrandimento



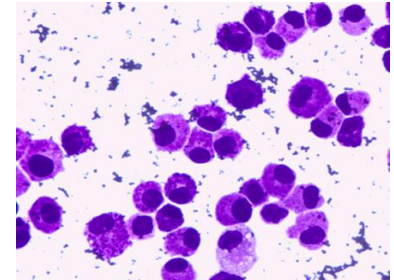
Colonia Granulocita-monocita

10X ingrandimento



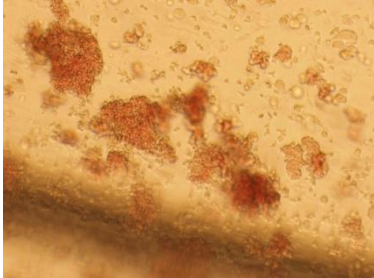
Colonia immatura

40X ingrandimento



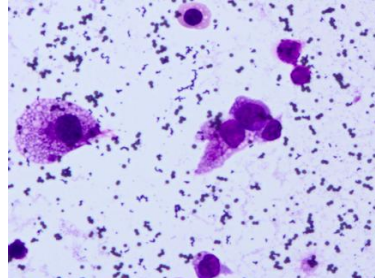
May-Grunwald-Giemsa staining

10X ingrandimento



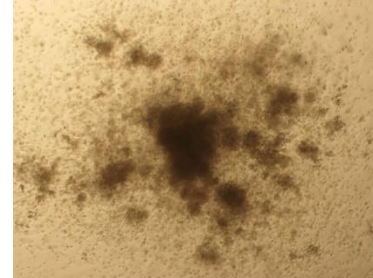
Colonia eritroide

40X ingrandimento



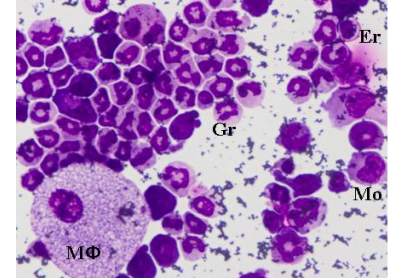
May-Grunwald-Giemsa staining

4X ingrandimento



Colonia GEMM
Granulocita-Eritrocita
Monocita-Megacariocita

40X ingrandimento



May-Grunwald-Giemsa staining

Conclusioni

Il nostro lavoro nell'ambito del progetto Superpig ha dimostrato che è possibile:

- 1) Ottenere cellule iPS pluripotenti, senza sequenze esogene, con cariotipo normale
- 2) Queste cellule possono essere, almeno in parte, indirizzate verso un destino ematopoietico, a giudicare dai marker di membrana e dalla capacità di formare colonie ematopoietiche

Ringraziamenti



ISTITUTO CLINICO
HUMANITAS



FONDAZIONE
FILARETE