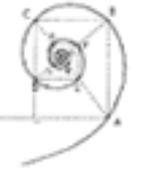


Maria Luisa FOCARELLI



Università degli Studi di Milano
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare



Curriculum di Genomica e Proteomica

Ciclo XXVI

Anno Accademico 2012/2013

Dottorando: Maria Luisa FOCARELLI

**Generazione di cellule staminali
pluripotenti indotte e loro correzione *in
vitro* in un modello murino di
Osteopetrosi**

CICLO XXVI

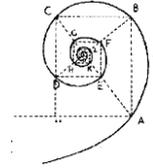
Direttore del Dottorato: Ch.mo Prof. Mario CLERICI

Tutore: Ch.mo Prof. Mario CLERICI

Correlatore: Dr. Paolo VEZZONI



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVI

Anno Accademico 2012/2013

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Settore Scientifico Disciplinare

MED/04

**Generazione di cellule staminali pluripotenti indotte
e loro correzione *in vitro* in un modello murino
di Osteopetrosi**

Dottorando : Maria Luisa FOCARELLI

Matricola N° R09218

TUTORE : Ch.mo Prof. Mario CLERICI

CO-TUTORE: Dr. Paolo VEZZONI

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Ch.mo Prof. Mario CLERICI

SOMMARIO

L'ingresso delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSc) nel panorama delle cellule staminali ha dato alla comunità scientifica un nuovo approccio per lo studio delle malattie umane e uno strumento promettente per la medicina rigenerativa. La generazione delle iPSc da pazienti affetti da malattie genetiche permette di superare problemi etici e tecnici dovuti alla manipolazione di cellule staminali e può consentire la correzione genetica sito-specifica, seguita dalla differenziazione e dal trapianto autologo per la cura delle malattie.

In questa tesi di dottorato, è stata presa in considerazione l'osteopetrosi maligna infantile, una malattia ossea recessiva causata da una mutazione nel gene *TCIRG1*, che colpisce gravemente l'attività di riassorbimento svolta dagli osteoclasti. Il risultante aumento della densità ossea provoca grave ritardo di crescita, ispessimento delle ossa e ridotta cavità midollare, sintomi ricapitolati dal modello murino *oc/oc*. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) è l'unico trattamento attuabile, tuttavia la possibilità di cura è fortemente limitata dalla necessità di un donatore compatibile. Pertanto, i pazienti dovrebbero beneficiare della generazione di cellule staminali ematopoietiche autologhe corrette, per un nuovo approccio alla terapia.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di generare iPSc da fibroblasti murini *wt* e *oc/oc* e correggere la mutazione del gene *TCIRG1*, con la futura prospettiva di differenziare le iPSc nella linea ematopoietica e trapiantare le cellule *in vivo* per ripristinare il fenotipo *oc/oc*.

Per generare le linee iPSc, come sistema di trasferimento dei geni riprogrammanti Oct4, Sox2 e Klf4, abbiamo utilizzato un vettore lentivirale policistronico di terza generazione che può essere eliminato dal genoma ospite mediante la Cre ricombinasi. Dopo la riprogrammazione, i cloni iPS

che presentavano un basso numero di copie di vettore e una normale distribuzione numerica dei cromosomi, sono stati scelti, trattati con la Cre ricombinasi e sub-clonati per ottenere linee senza vettori integrati. La pluripotenza delle iPSc così selezionate è stata testata mediante saggio di formazione dei teratomi, differenziazione *in vitro* dei foglietti germinali embrionali ed espressione dei marcatori di pluripotenza mediante immunostochimica e Real Time PCR. L'analisi del cariotipo ha evidenziato la presenza di normali set di cromosomi.

È importante sottolineare che le iPSc sono state ricavate con successo dai fibroblasti *oc/oc*, e successivamente corrette mediante ricombinazione omologa, trasfettandole con un vettore contenente il gene TCIRG1.

In conclusione, questo studio potrà fornire le premesse per il futuro uso clinico di un nuovo strumento per il trattamento dell'osteopetrosi e, potenzialmente, di altre malattie genetiche del sangue.

ABSTRACT

The induced pluripotent stem cells (iPSc) entrance in the stem cell landscape has given the scientific community a novel approach for studying human diseases and a new promising tool for regenerative medicine. iPSc generation from patients affected by genetic diseases could allow their site-specific genetic correction followed by differentiation and autologous transplantation for disease cure.

Infantile malignant osteopetrosis is a life-threatening recessive bone disease caused by a mutation in the *TCIRG1* gene, which severely affects osteoclasts resorbing activity. The resulting increased bone density causes severe growth retardation, thickened bones, and reduced medullary cavity, symptoms recapitulated by the *oc/oc* mouse. Hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is the unique possible treatment, however the chance of cure is strongly limited by the need for a matched donor. Therefore, patients should benefit from the generation of corrected autologous HSCs for a novel approach to therapy. The aim of the present thesis was to generate iPSc from murine *wt* and affected fibroblasts, to correct the *TCIRG1* genetic mutation, to differentiate iPSc into the hematopoietic lineage including HSCs, and to transplant them *in vivo* to revert the *oc/oc* phenotype.

To generate iPSc lines, as delivery system for the reprogramming genes Oct4, Sox2 and Klf4 we employed a third generation polycistronic lentiviral vector, excisable from the host genome by the Cre recombinase. After reprogramming, iPS clones with low vector copy number and normal numerical distribution of chromosomes were chosen, treated with Cre recombinase and sub-cloned to select lines without integrated vectors. Pluripotency of the obtained iPSc was tested by teratoma formation assay, embryonic germ layers *in vitro* differentiation, and expression of pluripotency markers through immunocytochemistry and real time PCR.

Karyotype analyses showed the presence of normal sets of chromosomes. Importantly, iPSc were successfully derived from *oc/oc* fibroblasts, and subsequently corrected through homologous recombination upon transfection with a BAC containing wt *TCIRG1*.

In conclusion, with our studies we will provide a proof of principle for the future clinical use of a new tool to treat osteopetrosis and potentially other genetic blood disorders.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	04
1.1. Cellule staminali embrionali.....	04
1.1.1. Definizione e limiti applicativi	04
1.2. Cellule staminali pluripotenti indotte	05
1.2.1. Induzione della pluripotenza in cellule differenziate	05
1.2.2. Cellule staminali pluripotenti indotte	07
1.2.3. Metodi alternativi per generare iPS	09
1.2.4. Vettori integranti eliminabili.....	11
1.3. Sicurezza e applicazioni delle iPSc	16
1.4. Osteopetrosi.....	19
1.4.1. Organizzazione dell'osso	19
1.4.2. Cellule e funzioni del tessuto osseo.....	20
1.4.3. Diverse forme di osteopetrosi.....	24
1.4.3.1. Osteopetrosi autosomica recessiva	24
1.4.4. Genetica dell'osteopetrosi maligna infantile.....	25
1.5. Trattamento dell'osteopetrosi.....	27
1.6. Modelli murini di Osteopetrosi	29
2. MATERIALI E METODI	32
2.1. Reagenti	32
2.2. Procedure.....	32
2.2.1. Topi	32
2.2.2. Colture cellulari.....	33
2.2.2.1. Isolamento dei fibroblasti embrionali di topo.....	33
2.2.2.2. Preparazione del substrato di cellule feeder	34
2.2.2.3. Isolamento dei fibroblasti murini	34
2.2.3. Trasduzione.....	35
2.2.4. Selezione delle cellule iPS.....	35

2.2.5. Lipofezione	36
2.2.6. Cariotipo.....	37
2.2.7. Tecnica FISH	38
2.2.8. Purificazione delle iPSc dalle cellule feeder	38
2.2.9. “Real-time quantitative PCR”	39
2.2.10. “Real-time quantitative RT-PCR”	41
2.2.11. Saggio della fosfatasi alcalina	44
2.2.12. Immunocitochimica	44
2.2.13. Saggio di formazione dei teratomi.....	45
3. RISULTATI	46
3.1. Generazione di cellule iPS	46
3.1.1. Generazione di cellule iPS murine wt	46
3.1.1.1 Vettori lentivirali di terza generazione.....	46
3.1.1.2 Eliminazione dei vettori lentivirali	52
3.1.1.3 Utilizzo di un solo vettore lentivirale policistronico di terza generazione per la derivazione di cellule iPS murine wt.....	55
3.1.1.4 Eliminazione del vettore lentivirale Policistronico.....	57
3.1.1.5 Caratterizzazione dei cloni iPSc	62
3.1.2 Generazione di cellule iPS da topi oc/oc.....	69
3.1.2.1 Derivazione di iPSc da topi oc/oc mediante vettore lentivirale policistronico di terza generazione.....	69
3.1.2.2 Eliminazione del vettore lentivirale Policistronico	74
3.1.2.3 Caratterizzazione delle linee iPS oc/oc	78
3.2 Correzione del difetto genetico delle linee iPS oc/oc.....	89

3.2.1	Caratterizzazione dei cloni iPS <i>oc/oc</i> corretti	90
4.	DISCUSSIONE	100
5.	CONCLUSIONI	105
6.	BIBLIOGRAFIA	106

LISTA DEI SIMBOLI

ADO:	Osteopetrosi Autosomica Dominante
AGM:	Regione aorta-gonade-mesonefro
ARO:	Osteopetrosi Autosomica Recessiva
b-FGF:	Basic fibroblast growth factor
BMP4:	Bone morphogenetic protein 4
CAII:	Anidrasi Carbonica II
Cdx4:	Caudal type homeobox 4
CFC:	Cellule formanti colonie
CLCN7:	Chloride channel 7
c-Myc:	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog gene
DAPI:	4,6-diamidino-2-phenylindone
DIC:	Contrasto di interferenza differenziale
DMEM:	Terreno Dulbecco's Modified Eagle
DMSO:	Dimetil solfossido
EBs:	Embryoid bodies
EDTA:	Acido etilendiamminotetracetico
EPO:	Eritropoietina
Er:	Eritroblasti
ESC:	Cellule staminali embrionali
ES-FBS:	Siero fetale bovino per cellule embrionali
FBS:	Siero fetale bovino
FISH:	Fluorescence in situ hybridization
FITC:	Isotiocianato di fluoresceina
Flt-3 ligand:	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
FRV:	Fast red violet
G-CSF:	Granulocyte colony stimulating factor
Gdf3:	Growth differentiation factor 3
GFP:	Green fuorescence protein
GvHD:	Graft-versus-host disease
HLA:	Human leucocyte antigens
HSC:	Cellule staminali ematopoietiche

HSCT:	Trapianto di cellule staminali ematopoietiche
IAO:	Osteopetrosi autosomica intermedia
IMDM:	Iscoe's Modified Eagle Medium
iPSc:	Cellule staminali pluripotenti indotte
Klf4:	Kruppel-like factor 4 gene
KO-DMEM:	Terreno knock out Dulbecco's Modified Eagle
LIF:	Leukemia inhibitor factor
Lin28:	Lin-28 homolog A gene
LTR:	Lunghe ripetizioni terminali
LV:	Vettore lentivirale
M-CSF:	Macrophage colony-stimulating factor
MEF:	Fibroblasti embrionali di topo
MMP9:	Metalloproteinasi di matrice 9
MOI:	Molteplicità di infezione
Nanog:	Nanog homeobox Gene
NK:	Natural killer cells
NLS:	Sito di localizzazione nucleare
OP9:	Osteopetrotic 9
OPG:	Osteoprotegerina
OSTM1:	Proteina transmembrana 1 osteopetrosi CLC7-associato
P/S:	Penicillina e streptomina
PBS:	Tampone fosfato salino
PCR:	Reazione a catena della polimerasi
PE:	Ficoeritrina
PFA:	Paraformaldeide
PLEKHM1:	Dominio di omologia per la plecstrina
RANK:	Recettore attivatore del fattore nucleare kappa-B
RANKL:	Ligando recettore attivatore del fattore nucleare kappaB
RL:	Lacuna di riassorbimento
RT-PCR:	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SA:	Sito accettore di splicing
SD:	Sito donatore di splicing
SCF:	Stem cell factor

SCNT:	Trasferimento nucleare di cellule somatiche
sffv:	Spleen focus-forming virus promoter
Sox2:	Sex determining region Y (SRY)-box 2 gene
SSEA-1:	Antigene embrionale stadio-specifico-1
SSEA-4:	Antigene embrionale stadio-specifico-4
SZ:	Sealing zone
TCIRG1:	T cell immune regulator 1
Tris-HCl:	Tris-idrossimetil-aminometano idrocloridro
Utf1:	Fattore trascrizionale di cellule embrionali indifferenziate
VCN:	Numero di copie del vettore
WPRE:	Elemento regolatore Woodchuck Hepatitis Virus
Zfp42:	Zinc finger protein 42 homolog

1. INTRODUZIONE

1.1. *Cellule staminali embrionali*

1.1.1. Definizione e limiti applicativi

Le cellule staminali embrionali (ESC) sono cellule pluripotenti caratterizzate da un elevato potenziale proliferativo, capacità di auto-rinnovarsi, ossia di generare almeno una cellula indifferenziata esattamente uguale alla cellula-madre e possibilità di differenziare in tutti i tessuti dei tre foglietti germinali embrionali: ectoderma, endoderma e mesoderma [1]. Le ESC possono essere isolate e coltivate a partire dalle cellule della massa cellulare interna della blastocisti, composta da cellule indifferenziate pluripotenti in grado di formare l'embrione e di specializzarsi per dare origine ai diversi tipi di cellule dell'intero organismo, e circondate da uno strato esterno chiamato trofoblasto, le cui cellule formano la parte fetale della placenta, il cordone ombelicale e le strutture associate.

Le prime ESC di mammifero sono state ottenute nel 1981 da blastocisti di topo [2], mentre la loro controparte umana è stata derivata negli anni 90 con diversi metodi di coltivazione e propagazione [3,4].

In laboratorio è possibile coltivare ESC *in vitro* per numerosi cicli di replicazione cellulare, mantenendole in uno stato indifferenziato, con una illimitata capacità proliferativa e cariotipo stabile, prima di stimolarle a generare cellule specializzate.

Quando iniettate nella cavità di una blastocisti ospite, le ESC colonizzano tutti i tessuti dell'embrione chimerico, compresa la linea germinale. Esse possono, pertanto, trasmettere un gene d'interesse alla progenie della chimera, permettendo così di creare modelli di malattie umane o di terapie in utero. Cellule ES sono state infatti utilizzate per generare diverse linee cellulari e topi transgenici [5]. Tra le varie malattie che potrebbero essere

curate con il trapianto di cellule staminali embrionali forzate a differenziare vi sono il morbo di Parkinson, il diabete, le lesioni traumatiche del midollo spinale, la degenerazione delle cellule di Purkinje, la distrofia muscolare di Duchenne, le malattie cardiache, nonché deficit visivi ed uditivi [6,7,8].

Tuttavia, l'uso di cellule ES umane è estremamente controverso, poiché la loro derivazione dalle cellule della massa cellulare interna della blastocisti presuppone la distruzione dell'embrione, sollevando non pochi problemi di natura etica [9].

Deve inoltre essere considerato il pericolo di rigetto, in quanto cellule staminali allogeniche risultano immunologicamente diverse dal paziente in cui verrebbero trapiantate e ciò richiederebbe procedure di immunosoppressione simili a quelle utilizzate per i trapianti di organo [10].

1.2. Cellule staminali pluripotenti indotte

1.2.1. Induzione della pluripotenza in cellule differenziate.

I primi esperimenti che hanno permesso di capovolgere le regole dimostrando che il genoma non viene modificato in maniera irreversibile durante il differenziamento, sono stati quelli di Nuclear Transfer effettuati più di cinquanta anni fa da John Gurdon, il quale ha dimostrato che nuclei di cellule intestinali adulte di *Xenopus laevis* erano in grado di generare interi organismi fertili quando trasferiti in cellule uovo private di nucleo [11].

Fattori riprogrammanti presenti nel citoplasma degli ovociti sono, infatti, in grado di riprogrammare il nucleo delle cellule somatiche, portando alla generazione di una blastocisti dopo diverse divisioni mitotiche [12].

Più di trenta anni dopo, con lo stesso metodo è stata ottenuta la clonazione della pecora Dolly, il primo mammifero ad essere clonato da cellule adulte [13]. Ciò ha generato molto dibattito nella comunità scientifica e pubblica in

generale, ma allo stesso tempo ha dato peso all'ipotesi di applicare questa tecnologia agli esseri umani [14].

In tempi più recenti, sono state messe a punto varie tecnologie di “somatic cell nuclear transfer” (SCNT) e sono stati effettuati esperimenti in cui cellule somatiche differenziate sono state fuse con ESC, dimostrando che fattori presenti nelle ESC sono sufficienti a conferire pluripotenza a nuclei differenziati [15,16].

Tuttavia quest'ultimo approccio genera cellule con cariotipo aneuploide, quindi inadatto a scopi terapeutici in ambito clinico umano [17].

Un'altra corrente di pensiero, incentrata sulla ricerca di un “master regulator”, si è generata alla fine degli anni '80, in seguito alla scoperta che il solo fattore di trascrizione di mammifero MyoD era in grado di convertire fibroblasti in miociti [18].

Molti ricercatori hanno cominciato a cercare il singolo fattore di trascrizione che potesse portare all'induzione di una determinata linea, ma i tentativi fallirono, con poche eccezioni (rivisto in [19]).

Un terzo filone di ricerca è quello che coinvolge le cellule ESC: fin da quando furono generate nel 1981 le prime ESC di topo [20], furono messe a punto condizioni di coltura ottimali che consentissero il mantenimento della pluripotenza a lungo termine, portando all'individuazione del leukemia inhibitory factor (LIF) e, analogamente per le ESC umane, del basic fibroblast growth factor (bFGF) [21].

Unendo i risultati delle diverse linee di ricerca si è giunti ad ipotizzare che la riprogrammazione delle cellule somatiche ad uno stadio embrionale è frutto di una combinazione di molteplici fattori presenti negli ovociti.

1.2.2. Cellule staminali pluripotenti indotte

La ricerca di un metodo per indurre la pluripotenza in cellule adulte differenziate, costringendole a ritornare ad uno stadio simil-embrionale, è stata stimolata dalla necessità di superare problemi di natura etica e tecnica, legati alla generazione e all'utilizzo di cellule staminali embrionali [1, 22].

Vari gruppi hanno cercato di individuare fattori di trascrizione espressi unicamente nelle ESC, ipotizzando che la loro espressione ectopica potesse essere sufficiente a conferire alle cellule differenziate caratteristiche proprie delle cellule pluripotenti.

Si è dovuti arrivare al 2006 affinché Yamanaka e colleghi potessero identificare quattro fattori di trascrizione che si sono rivelati sufficienti a riprogrammare i fibroblasti ad uno stato di cellule simil-ES, da essi definite "induced pluripotent stem cells" (iPSc) [23].

Utilizzando un approccio "riduzionista", i ricercatori hanno inizialmente somministrato ai fibroblasti di topo 24 fattori riprogrammanti, per poi rimuovere un fattore alla volta e ridurre così la lista iniziale a 4 geni: Oct4, Sox2, più i 2 oncogeni Klf4 e c-Myc.

Lo stesso principio è stato poi dimostrato essere valido anche per cellule umane [24,25].

L'espressione di Oct4 è una caratteristica distintiva delle cellule staminali pluripotenti, mentre Sox2 è espresso anche nelle cellule staminali neuronali e nelle cellule progenitrici; Klf4 è presente nella pelle, nello stomaco, nell'intestino e nel muscolo scheletrico, mentre c-Myc è espresso in maniera ubiquitaria.

I 4 fattori utilizzati da Yamanaka sono coinvolti in vari processi: sono necessari per la pluripotenza delle cellule staminali embrionali, per lo sviluppo embrionale e per la determinazione del destino cellulare.

In particolare, Oct4 è necessario per la formazione della massa cellulare interna degli embrioni e per il mantenimento della pluripotenza delle ESC [26,27] può formare un omodimero con se stesso o un eterodimero con Sox2, promuovendo la regolazione trascrizionale di geni target come Nanog [28].

Il gene Sox2, chiamato SRY- (Sex determining Region Y-) box2, codifica un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia di proteine Sox che si legano al DNA attraverso il loro dominio HMG [29].

Il gene Klf4, chiamato anche Kruppel-like zinc-finger protein 4, codifica un fattore di trascrizione ed è coinvolto nella asimmetria sinistra-destra durante lo sviluppo embrionale. Klf4 si lega direttamente all'eterodimero Oct4-Sox2 e complessi tetramericici contenenti DNA del gene target sono necessari per la riprogrammazione cellulare somatica [30].

Il gene c-Myc, omologo cellulare dell'oncogene v-myc, codifica un fattore di trascrizione e si lega al DNA attraverso il suo dominio helix-loop-helix, mentre forma eterodimeri con altre proteine attraverso il suo motivo leucine zipper. C-Myc è coinvolto nel mantenimento della pluripotenza delle ESC [31] e promuove la proliferazione cellulare inducendo l'acetilazione degli istoni.

A differenza di Oct4 che non può essere sostituito da nessun altro membro della famiglia Oct, gli altri 3 fattori potrebbero essere rimpiazzati da altri componenti della stessa famiglia: ad esempio Sox2 può essere sostituito da Sox1 e Sox3; Klf4 da Klf2 e Klf5, c-Myc da N-Myc e L-Myc [32].

Il gruppo di Thomson ha riprogrammato fibroblasti umani utilizzando un diverso set di fattori di trascrizione contenente i 2 geni aggiuntivi Nanog e Lin 28 [33].

Il gene Nanog è espresso nelle cellule staminali pluripotenti ed è coinvolto nella proliferazione cellulare e nell'auto-rinnovamento delle ES [34], mentre

Lin28 è coinvolto nella sintesi proteica, legandosi a specifici mRNA e guidandoli verso l'apparato di traduzione [35].

Una perplessità iniziale nell'uso delle iPSc riguardava la riattivazione e la conseguente sovra-espressione dell'oncogene c-Myc nelle cellule derivate da questi esperimenti, giocando esso un ruolo fondamentale nella proliferazione cellulare e tumorale [36].

Studi successivi hanno dimostrato che è possibile ottenere la riprogrammazione di cellule differenziate anche facendo a meno di questo gene, nonostante l'utilizzo di soli tre fattori renda il processo significativamente più lento [37]. Una soluzione per accelerare la riprogrammazione potrebbe essere fornita dall'impiego di altri geni coinvolti nella divisione cellulare o una espressione transiente di c-Myc.

Le iPSc presentano caratteristiche comuni a quelle delle cellule staminali embrionali, sia dal punto di vista morfologico, crescendo in colonie con classica forma a cupola, sia come condizioni di coltura, necessitando di uno strato di cellule che funga da feeder e della presenza di specifiche citochine. Le iPSc esprimono inoltre tutti i marcatori di staminalità specifici delle ES e mostrano un elevato tasso di proliferazione, capacità di auto-rinnovamento e possibilità di differenziarsi in vitro in tutti i tipi cellulari appartenenti ai 3 foglietti germinali embrionali.

Sono inoltre in grado di formare *in vivo* teratomi, tumori in cui sono presenti tutti i tessuti dell'organismo e, quando iniettate in una blastocisti, generare topi chimerici colonizzando tutti i tessuti dell'embrione compresa la linea germinale [36].

1.2.3. Metodi alternativi per generare iPSc

Il principale svantaggio dell'originale metodo di Yamanaka, che prevede l'uso di retrovirus per ottenere un'integrazione permanente dei geni riprogrammanti nel genoma, è costituito dal rischio di sviluppare tumori,

come conseguenza della residua espressione dei fattori riprogrammanti, in particolare la riattivazione degli oncogeni c-Myc e Klf4, nelle cellule differenziate generate a partire dalle iPSc [38].

La ricerca di protocolli più efficienti e sicuri ha spinto vari gruppi a sviluppare strategie alternative per generare iPSc, che prevedono, ad esempio, l'utilizzo di vettori virali non-integranti per l'introduzione dei fattori riprogrammanti, come gli adenovirus usati per riprogrammare epatociti di topo [39] o fibroblasti umani [40], nonostante questo sistema abbia un'efficienza non molto elevata e spesso richieda ripetute somministrazioni dei fattori di riprogrammazione.

L'utilizzo del Sendai virus (SeV) vector, basato su un virus a RNA che replica il suo genoma esclusivamente nel citoplasma, rappresenta un altro metodo privo di integrazione genomica che ha permesso di generare con successo iPSc da fibroblasti umani [41] e da cellule T circolanti [42].

Un altro sistema non-virale è costituito dalla trasfezione di DNA plasmidico, veicolante i fattori di riprogrammazione, che solitamente non si integra nel genoma ospite e dà espressione genica dopo 2-3 giorni [43].

Uno svantaggio di questo metodo, dovuto alla transiente espressione genica, è la bassa efficienza di trasfezione rispetto ai sistemi tradizionali basati su vettori retrovirali o lentivirali. Inoltre vi è il rischio che permangano frammenti di plasmidi o che vengano indotte mutazioni [44].

Un'altra metodologia non integrante si basa su vettori episomali auto-replicanti [38]. Una volta trasfettati, questi vettori si replicano una sola volta per ciclo cellulare e sono mantenuti come episomi stabili in circa l'1% delle cellule, in presenza di un agente selettivo e gradualmente persi, dopo la riprogrammazione, in assenza della selezione.

Recentemente, per prevenire l'integrazione di geni esogeni e eliminare il rischio di mutagenesi inserzionale, sono stati fatti tentativi per ottenere il trasferimento diretto di mRNA codificanti i fattori di trascrizione, anche se i

metodi usati prevedevano ripetute trasfezioni per avere una riprogrammazione completa, limitando l'applicabilità di questa strategia a cellule facilmente trasfettabili [45].

I migliori risultati in questa direzione sono stati ottenuti da Warren e colleghi che hanno utilizzato RNA sintetici modificati, protetti contro la risposta antivirale innata delle cellule verso l'RNA esogeno, somministrati mediante trasfezioni consecutive e in combinazione con inibitori degli interferoni [46]. L'efficienza di trasfezione ottenuta con questa innovativa strategia è di circa il 2%, tuttavia i ripetuti cicli di trasfezione necessari, rendono questo metodo non sostenibile da parte di cellule primarie fragili come le cellule ematopoietiche di pazienti con malattie del midollo osseo.

Infine, due gruppi indipendenti hanno recentemente ottenuto la riprogrammazione nucleare basata sull'espressione di un singolo cluster di microRNA, senza il bisogno di fattori di trascrizione esogeni. I microRNA sono una famiglia di RNA regolatori che reprimono l'espressione post-trascrizionale dei geni, come quelli che ostacolano la riprogrammazione, e sono essenziali per il normale sviluppo delle ES [47,48]. In un primo studio l'espressione del cluster miR-302/367, mediata da vettori lentivirali, ha mostrato un'alta efficienza di riprogrammazione sia in cellule di topo che in cellule umane [49].

Un secondo studio ha corroborato questi risultati mediante la trasfezione di una combinazione di mir-200 c, mir-302 s and mir-369 s [50]. Inoltre Subramanyam e colleghi hanno scoperto che la deplezione di alcuni target dei microRNA porta alla riprogrammazione cellulare [51].

1.2.4 Vettori integranti eliminabili

Un sistema alternativo e più vantaggioso dell'uso di vettori retrovirali è rappresentato dai lentivirus che, oltre alla loro capacità di infettare anche

cellule non in divisione, mostrano un profilo di integrazione più sicuro, riducendo i rischi di mutagenesi inserzionale [52].

Rimane comunque il rischio che l'integrazione stabile dei transgeni provochi trasformazioni maligne. Un passo in avanti verso una maggiore sicurezza nell'applicabilità di questo metodo è stato fatto grazie alla creazione di vettori lentivirali eliminabili, ingegnerizzati in maniera da contenere un sito *loxP* all'estremità 3'LTR e un promotore inducibile che guida l'espressione genica. Durante la retro-trascrizione virale, il sito *loxP* viene duplicato all'estremità 5'LTR in modo tale che la cassetta transgenica integrata nel cromosoma ospite risulti fiancheggiata da siti *loxP* ad entrambe le estremità. L'eliminazione dei fattori riprogrammanti avviene dopo l'espressione transiente e mirata della Cre ricombinasi nelle cellule transdotte. Questo enzima riconosce le 2 sequenze *loxP* con lo stesso orientamento ed induce un evento di ricombinazione tra i 2 siti, rendendo circolare la regione e permettendone l'asportazione [53]. Usando questo sistema Jaenisch e il suo gruppo sono stati in grado di generare iPSc umane prive di transgeni che mantengono il loro stato di pluripotenza e mostrano un profilo di espressione genica simile a quello delle cellule ES [54].

Il maggior limite di questo approccio è che i fattori riprogrammanti vengono integrati in diversi siti indipendenti, portando ad una escissione multipla dei transgeni in seguito all'espressione della Cre ricombinasi, e che queste simultanee reazioni di ricombinazione possono generare riarrangiamenti e instabilità genomica.

Per superare tale ostacolo, è stato progettato un vettore lentivirale policistronico codificante i determinati fattori di riprogrammazione, separati da sequenze peptidiche 2A, che porta all'integrazione di una singola cassetta riprogrammante floxata dai 2 siti *loxP* [55,56].

In seguito all'azione della Cre ricombinasi tutti i transgeni possono essere eliminati contemporaneamente e le linee cellulari iPS generate contengono solo 3 sequenze LTR lentivirali residue che consistono di un singolo sito loxP che non interrompe sequenze codificanti, promotori o elementi regolatori. Sebbene risulti elegante, questo sistema conserva comunque il rischio che si verifichino eventi di ricombinazione e che l'espressione della Cre non sia abbastanza finemente regolata.

Come alternativa ai vettori virali, vi è il sistema piggyBac che si basa sull'uso di trasposoni/trasposasi e combina un efficace meccanismo di trasferimento dei transgeni alle cellule riceventi con la possibilità di rimuovere tutto il DNA esogeno in seguito alla riprogrammazione [57, 58,59].

Generalmente le cellule somatiche vengono co-trasfettate con un plasmide donatore contenente il trasposone, in cui i transgeni sono fiancheggiati da ripetizioni terminali invertite, e un plasmide helper codificante la trasposasi, la cui temporanea espressione permette la completa rimozione del vettore riprogrammante [60].

Il sistema piggyBac è in grado di incrementare l'efficienza di riprogrammazione semplificando il processo di escissione, grazie alla capacità di trasferire grandi frammenti di DNA (circa 10 Kb), quali le cassette policistroniche riprogrammanti.

Il vettore rimosso dall'attività della trasposasi non viene quasi mai reintegrato in una nuova posizione nel genoma, consentendo così la generazione di cellule iPS geneticamente inalterate.

Nonostante l'entusiasmo con cui è stato accolto dalla comunità scientifica, il sistema piggyBac richiede una precisa caratterizzazione dei siti di integrazione mediante sequenziamento del DNA, prima e dopo la rimozione del trasposone, poiché rari cloni possono contenere microdelezioni [61].

La necessità di questo laborioso screening e il potenziale rischio di effetti genotossici ha finora limitato l'applicabilità di questa tecnica su larga scala.

Un altro ostacolo da non sottovalutare è rappresentato dalla bassa frequenza di riprogrammazione: infatti, anche quando milioni di cellule vengono indotte a de-differenziarsi, solo una piccolissima percentuale di esse va incontro ad un processo completo di riprogrammazione [62,63].

Per favorire il processo di generazione delle iPSc, evitando modificazioni permanenti del genoma, vari gruppi hanno messo a punto protocolli che prevedono l'aggiunta di piccole molecole di composti chimici, come l'acido valproico, un inibitore delle istone deacetilasi, che consente di ottenere la riprogrammazione usando solo 2 fattori di trascrizione, Oct4 e Klf4 [64] o Oct4 e Sox2 [65].

Diversi studi hanno suggerito che la proteina p53, un potente soppressore tumorale, svolge un ruolo primario nel mantenimento dell'omeostasi cellulare [66-68], e che la sua sottoregolazione è sufficiente a determinare la riprogrammazione di cellule normalmente resistenti a questo processo, come i neuroni terminalmente differenziati [69].

Un incremento dell'efficienza di riprogrammazione è stato ottenuto anche grazie alla regolazione di altri soppressori tumorali come p27 e Ink4a/Arf, o di p21, un effettore a valle di p53 [70-72]. L'eliminazione di questi geni, tuttavia, non è scevra di rischi.

Oltre all'espressione di geni che inibiscono la proliferazione cellulare, sono state individuate altre barriere che impediscono alle cellule di subire la riprogrammazione verso la pluripotenza.

Di grande importanza sono le modificazioni epigenetiche che le cellule subiscono, infatti la riprogrammazione delle cellule somatiche è un processo che comporta un'imponente riconfigurazione della struttura della cromatina, a partire dalla metilazione del DNA fino ai cambiamenti del nucleosoma [73] soprattutto al fine di consentire l'accesso del macchinario

di trascrizione ai geni della pluripotenza. Il rimodellamento della cromatina è un fattore limitante nella riprogrammazione in quanto possiede la capacità di abolire l'espressione indesiderata di geni specifici di una linea e, in particolare, la metilazione del DNA è risultata essere un grosso ostacolo cinetico al processo di de-differenziamento [74] avvalorando l'importanza dell'uso di composti chimici che possono modulare lo stato di metilazione del DNA e i cambiamenti della cromatina.

Ad esempio, il trattamento di cellule di topo, parzialmente riprogrammate, con l'inibitore della metilazione 5-aza-citidina (AZA), così come una diminuzione della metiltrasferasi di mantenimento Dnmt1, hanno aumentato significativamente l'efficienza di riprogrammazione, portando ad una completa riprogrammazione delle iPS [75].

Per far sì che le cellule vadano incontro ad un processo di conversione completo, oltre alla metilazione del DNA, devono essere rimosse anche le modificazioni repressive degli istoni.

Recentemente, è stato dimostrato che la vitamina C può promuovere la riprogrammazione riducendo i livelli globali di metilazione della lisina 36 dell'istone H3 (H3K36) [76]. Inoltre Chen e collaboratori hanno dimostrato che l'efficienza di riprogrammazione può essere aumentata anche mediante la totale rimozione della metilazione della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9), sia silenziando la metiltrasferasi Setdb1 sia tramite la sovra-espressione della demetilasi Kdm4b [77].

Come risultato degli sforzi combinati mirati a generare in maniera efficiente cellule pluripotenti, prive di alterazioni genomiche, è stata riprogrammata un'ampia gamma di cellule somatiche umane, compresi melanociti [78], cellule derivate da sangue del cordone ombelicale [79,80], cellule di sangue periferico adulto [81,82], cellule ottenute da tessuto adiposo [83-86], epatociti [87] e fluido amniotico [88,89].

1.3. Sicurezza e applicazioni delle iPSc

Una delle questioni più importanti riguardanti le iPSc è se siano o meno diverse dalle ESC, considerate come un “gold standard”, e se le eventuali differenze risultino funzionalmente rilevanti. A partire dal 2009 numerosi studi hanno cominciato a riportare l'esistenza di differenze tra iPSc e ESC, identificando centinaia di geni diversamente espressi e individuando una persistente espressione genica delle cellule del donatore nelle iPSc derivanti: è stato infatti dimostrato che cellule iPS con una residua espressione di geni tessuto-specifici, derivante da una incompleta metilazione del DNA del promotore, si differenziano preferenzialmente nella linea da cui sono stati derivati, indicando l'esistenza di una cosiddetta “memoria epigenetica” delle cellule del donatore [86,88,90-92]. Anche altri studi hanno confrontato i due tipi di linee cellulari staminali, riportando differenze nella metilazione del DNA [93-97].

Lavori successivi hanno tuttavia concluso che risulti difficile poter distinguere i due tipi di linee pluripotenti sulla base della sola espressione genica o della metilazione del DNA, in quanto presentano delle variazioni sovrapposte, quando analizzati per queste caratteristiche [98,99].

Un altro importante fattore da prendere in considerazione è se vi siano divergenze funzionali nella capacità di differenziare da parte delle due linee staminali.

Linee iPS umane derivate da cellule beta pancreatiche differenziano in cellule secernenti insulina in maniera più efficiente se confrontate con ES umane [100].

Conclusioni contrastanti sono state riportate, invece, sulla similarità tra iPSc e ESC, per quanto riguarda ad esempio la capacità della differenziazione neuronale [101,102].

Benché siano state osservate molteplici variazioni tra i vari cloni iPS e nonostante alcuni di questi cloni differiscano dalle ESC nell'espressione genica, nella metilazione del DNA e nella capacità differenziativa, sembra che, almeno in parte, ciò possa essere dovuto a differenze nelle condizioni di coltura e ai diversi metodi di induzione delle iPSc adottati nei vari laboratori [103,104].

Sono molte, infatti, le variabili tecniche, come la combinazione dei fattori riprogrammanti o i metodi di rilascio dei geni, che possono influenzare la qualità delle iPSc, oltre ad eventi stocastici, non controllabili, che possono verificarsi durante la riprogrammazione. Studi successivi indicano, inoltre, che molte delle differenze genetiche trovate nelle iPSc sono già presenti con una bassa frequenza nelle cellule somatiche di partenza, indipendentemente dal processo di riprogrammazione e che possono poi diventare evidenti in una popolazione clonale da esse derivata [105,106].

Un recente lavoro ha indirizzato l'attenzione sulla immunogenicità delle iPSc. I ricercatori hanno trapiantato cellule iPS in riceventi singenici, ma hanno inaspettatamente osservato una risposta immunitaria T cell-dipendente dovuta ad una anomala espressione genica di antigeni che rompono la tolleranza periferica [107]. Il significato di questo studio è tuttavia stato recentemente messo in dubbio.

Sulla base di queste osservazioni, l'utilizzo delle cellule iPS nella terapia medica richiede necessariamente la scelta di metodi di riprogrammazione più sicuri, la selezione di cloni integri dal punto di vista genetico ed epigenetico, capaci di differenziarsi *in vitro* e con bassa immunogenicità.

Di fondamentale importanza è, infatti, la possibilità di utilizzare queste cellule nel campo della medicina rigenerativa, prima di tutto per l'opportunità che esse offrono di ottenere linee cellulari staminali paziente-specifiche in grado di differenziarsi nel tipo cellulare desiderato, in secondo luogo perché permettono di superare problemi di reperibilità senza ricorrere

a procedure invasive. Inoltre sono in grado di fornire un modello-malattia per lo studio dei processi cellulari e molecolari coinvolti nell'insorgenza e nello sviluppo della patologia, nonché un'ottima piattaforma per lo screening farmacologico e tossicologico: ad esempio, la correzione del gene responsabile di una malattia in cellule iPS potrebbe offrire un perfetto controllo per studi farmaceutici comparativi *in vitro* (Figura 1).

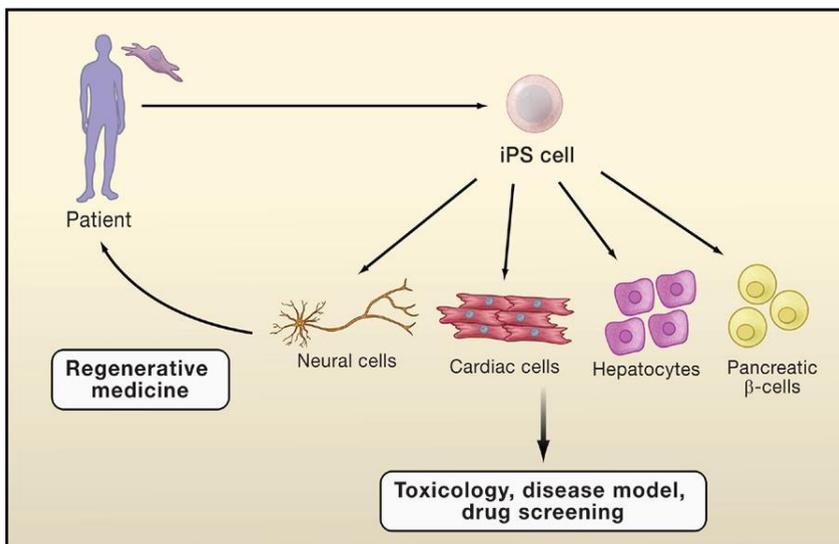


Figura 1. Applicazione delle cellule staminali pluripotenti indotte. Le iPSc possono essere impiegate per creare modelli-malattia, per lo screening di medicinali e nella medicina rigenerativa, per curare i pazienti attraverso il trapianto cellulare [108].

1.4. Osteopetrosi

L'osteopetrosi è una malattia dell'osso dovuta ad un difetto dell'osteoclasta, che è una cellula di origine ematopoietica e che, per questo motivo, è curabile con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche da donatori eterologhi, anche se i pazienti potrebbero beneficiare significativamente dell'utilizzo di cellule autologhe corrette in grado di ricostituire il sistema ematopoietico compromesso. Per questo motivo il trattamento della malattia potrebbe avvantaggiarsi del trapianto autologo di cellule iPS corrette e differenziate in cellule staminali ematopoietiche.

1.4.1. Organizzazione dell'osso

Per la sua comprovata derivazione mesenchimale, il tessuto osseo viene classificato, insieme alla cartilagine con cui forma lo scheletro, come un tessuto connettivo di sostegno. L'osso è un tessuto altamente specializzato e svolge tre importanti funzioni: meccanica o di sostegno, come supporto per l'inserzione dei muscoli nella locomozione; protettiva, come scudo per organi vitali quali il sistema nervoso centrale, gli organi della cavità toracica e il midollo osseo; metabolica, come struttura di riserva di ioni (principalmente calcio e fosfato), fattori di crescita e citochine.

La sostanza intercellulare ossea è formata da due fasi: una matrice organica, costituita prevalentemente da collagene di tipo I (che rappresenta circa il 90 % delle proteine ossee), organizzato in fibre che rendono il tessuto elastico e flessibile, ed una inorganica, contenente ioni sotto forma di idrossiapatite, responsabile della durezza delle ossa [109].

Il tessuto osseo viene sistematicamente rinnovato durante tutta la vita di un individuo: ogni segmento scheletrico subisce un rinnovamento costante che avviene attraverso un lavoro coordinato di distruzione e ricostruzione, noto come rimodellamento osseo.

Questo processo fisiologico di bilanciamento tra formazione e demolizione (osteolisi) delle ossa è essenziale per il mantenimento dell'architettura, della qualità e della resistenza dell'osso; consente inoltre la riparazione di eventuali danni e soddisfa le esigenze di calcio del corpo, mobilizzandolo dalle ossa al sangue e rendendolo così metabolicamente disponibile.

Questo equilibrio è mantenuto anche a livello endocrino per mezzo della precisa regolazione degli ormoni osteotropici e calciotropi [110].

1.4.2. Cellule e funzioni del tessuto osseo

Il rimodellamento osseo è un evento dinamico, che prevede il mantenimento dell'equilibrio tra due attività strettamente correlate: la deposizione di nuovo tessuto osseo da parte degli osteoblasti e il riassorbimento effettuato dagli osteoclasti [111].

Gli osteoclasti sono cellule altamente specializzate ed uniche per la loro capacità di riassorbire la matrice ossea mineralizzata. Sono sincizi multinucleati formati dalla fusione di un numero variabile di precursori mononucleati e possono contenere da 2 a circa 30 nuclei. Sono cellule di grandi dimensioni, con un diametro che varia da 50 a 100 µm, possiedono mitocondri pleomorfi, numerosi vacuoli e lisosomi, e membrane dell'apparato del Golgi ben sviluppate. Presentano un'elevata attività di fosfatasi acida tartarato-resistente (TRAP), tanto che la presenza di questo enzima è utilizzata come marker di riconoscimento cellulare. La regione di adesione al substrato osseo è chiamata 'zona di saldatura' (SZ) ed è caratterizzata dalla presenza di un anello costituito da filamenti di F-actina orientati perpendicolarmente alla superficie dell'osso, in grado di formare minuscole protrusioni dette podosomi o contatti focali (Figura 2).

Queste cellule si presentano in forme molto variabili: possono essere adiacenti alla superficie ossea con aspetto polarizzato o distaccati dalla matrice con aspetto irregolare.

Gli osteoclasti, infatti, sono cellule mobili che si staccano dalla matrice dopo il riassorbimento e aderiscono ad un altro sito in prossimità del primo, grazie ad interazioni cellula-cellula e cellula-matrice mediate da molecole di adesione specializzate, situate sulla membrana, come le integrine, la vinculina, la talina e specifiche proteine della matrice [105].

Lo spazio tra cellule e matrice ossea è denominato 'lacuna di riassorbimento' (RL). La membrana cellulare che si affaccia di fronte alla lacuna è chiamata 'ruffled border' (confine arruffato) per la presenza di numerose estroflessioni che hanno il compito di ampliare la superficie della membrana stessa e che sono a contatto diretto con la matrice ossea.

La membrana promuove il traffico vescicolare associato alla secrezione degli enzimi proteolitici, come la cisteina-proteinasi catepsina K e la metalloproteinasi di matrice 9 (MMP9), e ospita numerose pompe protoniche vacuolari che secernono HCl, responsabile del basso pH richiesto per il dissolvimento della matrice mineralizzata [112,113], (Figura 2). Il taglio del collagene di tipo I è mediato principalmente dagli enzimi lisosomiali, come la TRAP e la β glucuronidasi, o da enzimi non lisosomiali, come la catepsina K, attiva a pH basso, e la MMP9 [114]. I protoni che acidificano l'ambiente sono prodotti dall'anidrasi carbonica II (CAII), un enzima che catalizza la conversione di CO_2 e H_2O in H_2CO_3 , che poi si dissocia in H^+ e HCO_3^- [115]. Gli ioni H^+ sono trasportati all'esterno delle cellule nella lacuna di riassorbimento dalla pompa protonica vacuolare H^+ -ATPasi, mentre gli ioni HCO_3^- vengono estrusi attraverso lo scambio con ioni Cl^- da una pompa che dissipa il potenziale di membrana generatosi. In seguito, i canali ClC7 trasportano il cloro alla zona di rimodellamento osseo [116]. La secrezione acida è modulata da regolatori, come l'ormone paratiroideo PTH e la prostaglandina E2 (PGE2) che aumentano l'acidità, o la calcitonina, che la diminuisce.

Il materiale degradato è rimosso dalla lacuna di riassorbimento dagli osteoclasti attraverso un processo di transitosi e viene poi distrutto nei lisosomi.

La formazione ossea inizia quando le cavità di riassorbimento sono popolate da cellule mononucleate chiamate osteoblasti. Un ciclo completo di rimodellamento dura quattro mesi e prevede 20-30 giorni per il riassorbimento e tre mesi per la formazione dell'osso. Gli osteoblasti hanno forma cubica con un grande nucleo e apparato del Golgi e reticolo endoplasmatico estesi, caratteristiche che indicano alti livelli di sintesi proteica. Queste cellule sono deputate alla formazione di nuovo tessuto osseo, mediante la secrezione di collagene di tipo I, osteocalcina, osteopontina, osteonectina e grandi quantità di calcio e fosfato. Gli osteoblasti derivano da precursori chiamati osteoprogenitori, facenti parte delle cellule staminali mesenchimali, che si differenziano in pre-osteoblasti e poi in osteoblasti [117,118].

La differenziazione è controllata da ormoni osteotropici e citochine come BMP, TGF , IGF, Wnt, PTH, 1α , 25 diidrossivitamina D3 e calcitonina [112,120-123]. Dopo aver svolto il loro compito, muoiono per apoptosi o si differenziano in osteociti [118].

Gli osteoclasti appartengono al compartimento mieloide delle cellule staminali ematopoietiche. Queste si differenziano diventando monociti, che a loro volta sono diretti verso la linea macrofagica, o si differenziano in pre-osteoclasti proliferanti. Essi poi si fondono per formare gli osteoclasti, che vanno incontro a polarizzazione e riorganizzazione del citoscheletro, fondamentali nell'attività di riassorbimento.

La differenziazione degli osteoclasti è supportata dalle cellule stromali del midollo osseo, cellule precoci della linea osteoblastica simili agli osteoblasti [124].

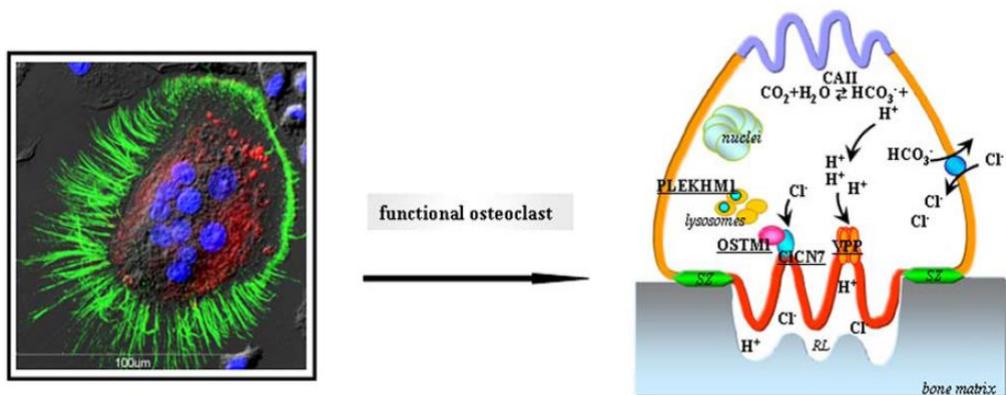


Figura 2. Osteoclasti funzionali, multinucleati, con attività di riassorbimento. A sinistra l'immagine al microscopio confocale di un osteoclasta derivato da cellule mononucleate di sangue periferico di un donatore sano, differenziate *in vitro*. La figura a destra descrive le caratteristiche di questo tipo di cellula: quelli sottolineati sono i geni coinvolti nella patogenesi dell'osteopetrosi umana. RL, lacuna di riassorbimento; SZ, zona di saldatura, la regione di adesione alla matrice ossea. (modificato da [119]).

Gli osteoblasti esprimono il recettore attivatore del fattore nucleare kappa-B (RANKL), ligando del recettore RANK che induce l'espressione di NF-kB e la produzione di M-CSF, fattore che, una volta secreto, stimola le colonie di macrofagi. La vicinanza tra la linea osteoblastica e quella ematopoietica è necessaria per il legame di RANKL e M-CSF con i loro rispettivi recettori, RANK e c-fms, espressi da monociti e macrofagi. M-CSF è coinvolto nella sopravvivenza degli osteoclasti maturi impedendo l'apoptosi e la mobilità delle cellule e bloccando il riassorbimento dell'osso [125]. RANKL è in grado di dare il via a formazione, fusione, attivazione e polarizzazione, nonché attività di riassorbimento degli osteoclasti, così come all'attivazione degli osteoclasti maturi che promuovono il riassorbimento osseo [126]. RANKL è il fattore necessario e sufficiente per l'induzione

dell'osteoclastogenesi [127]. Inoltre, gli osteoblasti secernono un recettore per RANKL, chiamato osteoprotegerina (OPG), che agisce come un inibitore paracrino della fusione e differenziazione degli osteoclasti, innescando una competizione con RANK per il legame con RANKL. Infine, le cellule T e B producono molteplici citochine che promuovono o inibiscono la differenziazione osteoclastica [128].

1.4.3. Diverse forme di osteopetrosi

Con il termine di osteopetrosi viene indicato un gruppo eterogeneo di malattie ossee rare a trasmissione ereditaria. Sono presenti diverse forme cliniche come l'osteopetrosi autosomica dominante (ADO), generalmente caratterizzata dalla presenza di molteplici fratture e osteomielite; l'osteopetrosi autosomica intermedia (IAO), che presenta alcune anomalie ossee, perdita della vista e dell'udito associati a lieve anemia, e l'osteopetrosi autosomica recessiva (ARO), che manifesta il fenotipo più grave [119,129,130].

1.4.3.1. Osteopetrosi autosomica recessiva

La ARO, nota anche come osteopetrosi maligna infantile, è una condizione potenzialmente letale causata da un difetto nell'attività di riassorbimento degli osteoclasti, che provoca uno squilibrio tra riassorbimento osseo e mineralizzazione. Questo causa un aumento della densità e una ridotta resistenza dell'osso, condizioni che comportano il rischio di fratture multiple, solitamente nelle ossa lunghe, che possono causare deformità e infiammazione a causa della loro difficoltà a guarire. La mancanza di

riassorbimento osseo provoca osteosclerosi dell'intero scheletro appena dopo la nascita. I pazienti presentano difetti di crescita, anomalie dentarie, ipocalcemia e iperparatiroidismo secondario. Inoltre, la mancanza di riassorbimento osseo provoca una mancata formazione della cavità midollare, che a sua volta porta ad anemia, trombocitopenia e ematopoiesi compensativa extramidollare nella milza e nel fegato. Di conseguenza, questi organi si ingrandiscono dando epato-splenomegalia con funzionalità ridotta o compromessa. Spesso i pazienti hanno bassi valori di ematocrito e un diametro ridotto dei forami cranici che determina compressione dei nervi e possibile cecità e sordità congenite [131]. L'insorgenza della ARO avviene in prossimità della nascita e senza trattamento la prognosi è grave a causa della fibrosi del midollo osseo e delle infezioni secondarie [132]. I pazienti osteopetrotici possono essere distinti in casi "osteoclast-rich" caratterizzati dalla presenza di normale o aumentato numero di osteoclasti multinucleati incapaci di riassorbire l'osso, e forme "osteoclast-poor" in cui gli osteoclasti sono assenti [119].

1.4.4. Genetica dell'osteopetrosi maligna infantile

La differenziazione degli osteoclasti può essere difettosa per diversi motivi. In modelli murini e recentemente anche negli esseri umani, i lavori descrivono casi di osteopetrosi "osteoclast-poor", dovuti a difetti in RANK [133] e nel suo ligando RANKL [134]. Essi sono caratterizzati da diversi difetti ossei che si verificano entro il primo anno di vita. Da rimarcare il fatto che alcuni pazienti portatori di mutazioni nel gene RANKL, manifestano ipogammaglobulinemia, bassa risposta alla vaccinazione e una diminuita percentuale delle cellule B di memoria [133].

Al contrario, le forme "osteoclast-rich" sono causate da un difetto di acidificazione della lacuna di riassorbimento: il primo gene identificato è stato quello dell'anidrasi carbonica II che provoca l'ARO con acidosi tubulare renale e con un decorso clinico lieve [135].

Inoltre, alcuni pazienti possono mostrare disabilità intellettiva e calcificazioni cerebrali [136]. Il gene più frequentemente mutato è TCIRG1 (T cell immune regulator 1), codificante per la subunità $\alpha 3$ della pompa ATPasi di tipo vacuolare trasportante protoni (V-ATPasi) [137].

Le ATPasi di tipo Vacuolare sono strutture complesse di grandi dimensioni, costituite da due subunità: un dominio V_0 immerso nella membrana ed uno periferico V_1 che si estende nel citoplasma, dalla parte esterna della membrana della vescicola. La regione che attraversa la membrana forma un canale che veicola i protoni attraverso la membrana stessa, mentre la porzione citoplasmatica è responsabile dell'idrolisi dell'ATP e dell'attività di pompaggio di H^+ attraverso il canale [138]. La subunità α , chiamata anche subunità 116-kDa, è il componente principale del dominio V_0 ed esiste in quattro tipi tessuto-specifici. In particolare, la subunità $\alpha 3$ è ubiquitariamente espressa, ma è 100 volte maggiore negli endosomi tardivi, nei lisosomi e nella membrana plasmatica durante la differenziazione degli osteoclasti [139].

Negli osteoclasti coinvolti nel riassorbimento osseo, la V-ATPasi è responsabile della produzione di H^+ e della conseguente secrezione acida nello spazio extracellulare tra osteoclasti e superficie ossea. Un'altra forma di osteopetrosi è legata a difetti nel trasporto di cloruro, principalmente a causa di mutazioni nel gene CLCN7 (chloride channel 7) [140]. Le mutazioni che causano questa malattia sono missenso o nonsense e sono presenti in entrambi gli alleli dei pazienti. Sono caratterizzati da un ampio spettro di fenotipi, dalla forma grave a quella lieve.

La forma più grave può presentare anche sintomi neurologici, come la degenerazione retinica e l'atrofia cerebrale, difetti primari indipendenti dai problemi ossei, in contrasto con le forme TCIRG1-dipendenti. Un ruolo importante è giocato dai lisosomi, che degradano il materiale raccolto. In questi organelli sono presenti complessi proteina transmembrana 1 osteopetrosi CLC7-associati (OSTM1), in cui OSTM1 è una proteina transmembrana un tipo I con attività di legame con l'ubiquitina [141]. Mutazioni nel gene OSTM1 causano osteopetrosi di tipo "osteoclast rich" [142] e patologia lisosomiale [143], in modo simile alla perdita di CLC7. Queste forme di ARO sono estremamente gravi a causa della drammatica degenerazione del sistema nervoso centrale. I pazienti soffrono di neurodegenerazione, atrofia ottica, microcefalia, atrofia corticale [144]. Infine, è stato dimostrato che mutazioni in un'altra molecola, la proteina contenente il dominio di omologia per la plecstrina (PLEKHM1), localizzata sui lisosomi, possono causare una lieve forma di osteopetrosi [145]. Benché negli ultimi dieci anni siano stati identificati numerosi geni responsabili di diverse forme di osteopetrosi, rimane ancora un 30% di pazienti con mutazioni in geni sconosciuti. La possibilità di diagnosi molecolare ha aperto la strada ad una precisa analisi della eterogeneità delle osteopetrosi con conseguenti implicazioni cliniche. Questi risultati ci permettono di eseguire diagnosi prenatale e, in parallelo, di indagare nuovi strumenti terapeutici che evitino o limitino la gravità della malattia.

1.5. Trattamento dell'osteopetrosi

Ad oggi, l'unico trattamento disponibile per la cura di queste malattie è il trapianto di cellule staminali ematopietiche (HSCT), data l'origine ematopoietica degli osteoclasti. Questo approccio all'osteopetrosi è stata

perpetrato sin dal 1980 [146]. Da considerare che, ad esempio, l'ARO "osteoclast-poor" dovuta a mutazioni nel gene RANKL non può essere curata con il trapianto, perché la proteina implicata è espressa da osteoblasti e cellule stromali, linee derivate da cellule staminali mesenchimali [133] .

Dopo il trapianto, le cellule normali trasferite nel paziente differenziano e sostituiscono quelle malate, ripristinando un normale equilibrio ematologico, immunologico e osseo. Il trapianto può portare anche alla prevenzione di sintomi come l'osteosclerosi e la emopoiesi extramidollare nel caso in cui venga effettuato prima della loro comparsa. Difetti secondari, come la perdita della vista e dell'udito, dovute alla compressione dei nervi cranici, possono essere prevenute mediante il trapianto, ma non revocate. Altri difetti del compartimento oculare o neurologico, che di solito si verificano nelle osteopetrosi CLCN7 e OSTM1, non possono essere curate con il trapianto.

Il successo del trapianto dipende inoltre dal buon attecchimento delle cellule che richiede un condizionamento mediante irradiazione o agenti chimici. In aggiunta, deve essere valutata l'eventuale insorgenza di rigetto e della malattia del trapianto contro l'ospite (GvHD), una delle principali complicazioni del trapianto allogenico, che si verifica quando le cellule T del donatore rispondono alle proteine non-self sulle cellule ospiti. La GvHD è una malattia immunologica che colpisce molti organi, come il tratto gastrointestinale, fegato, pelle e polmoni. La sua insorgenza dipende dal grado di HLA non corrispondenti, dalla differenza di età e sesso tra donatore e ricevente, dalla fonte di cellule e dall'intensità del regime di condizionamento [147]. I vantaggi dell'HSCT sono quindi fortemente limitati dalla necessità di un donatore compatibile. Utilizzando donatori con HLA identico la percentuale di successo è di circa il 73%, mentre con donatori HLA-correlati è di circa il 43% [148]. Gravi complicazioni sono state

osservate soprattutto quando si utilizzano fonti di cellule staminali alternative, come le cellule staminali ematopoietiche impoverite di cellule T da donatori HLA-aploidentici o sangue del cordone ombelicale da donatori non imparentati [149]. Le complicazioni includono il rigetto, una ritardata ricostituzione ematopoietica, occlusione venosa, ipertensione polmonare e crisi ipercalcemica [150].

Tuttavia, come già accennato, i danni causati dall'osteopetrosi si verificano già prima della nascita e le terapie attuali non consentono il recupero di nessuna delle complicazioni irreversibili, come la cecità e la sordità dovute alla compressione del nervo intracranico. È quindi evidente che la qualità della vita migliora se il trapianto viene effettuato precocemente, prima che la malattia si manifesti.

Recenti studi hanno proposto un approccio, ancora in fase di sperimentazione in modelli animali, in cui l'HSCT viene eseguito il prima possibile direttamente in utero [151].

Questo approccio previene l'insorgenza del rigetto delle cellule trapiantate e lo sviluppo della malattia prima della nascita [152,153].

Non sono stati osservati effetti collaterali o GvHD. Pertanto lo stesso metodo dovrebbe essere preso in considerazione per il trattamento dei pazienti. La diagnosi prenatale di osteopetrosi potrebbe così fornire la possibilità di eseguire il trapianto durante la vita fetale, come già riportato per altre malattie genetiche [154, 155].

1.6. Modelli murini di Osteopetrosi

Tra tutti i modelli murini di osteopetrosi dovuti a difetti nella funzione degli osteoclasti, quelli con mutazioni negli stessi geni coinvolti nella patologia umana sono il modello *oc/oc* (dove 'oc' sta per osteosclerosi), *CLCN7 -/-* e

il mutante letale grigio (gl/gl). Il mutante spontaneo *oc/oc* presenta un troncamento nel gene *TCIRG1* [156] e ben riproduce la corrispondente forma di osteopetrosi osservata nell'uomo. Il topo mutante *CLCN7* *-/-* e il modello spontaneo *gl/gl* portano una mutazione nel gene *OSTM1*, [140, 143] e mostrano una grave osteopetrosi con degenerazione neuronale e della retina primaria, come riportato nei pazienti.

Nel presente lavoro abbiamo concentrato i nostri studi sul modello murino *oc/oc* che presenta un grave ritardo della crescita, ossa ispessite e ridotta cavità midollare. In particolare, nei topi *oc/oc* la pompa V-ATPasi è presente nel compartimento endosomale, ma è assente nella membrana plasmatica, con conseguente impossibilità di acidificare l'ambiente osseo. I topi affetti presentano grave osteopetrosi con tipiche caratteristiche radiologiche e istologiche, che muoiono da 3 a 5 settimane dopo la nascita (Figura 3).

La loro ematopoiesi è alterata, con una maggiore differenziazione mielomonocitica nel midollo osseo, nel fegato e nella milza, ma con una assenza di differenziazione verso i linfociti B. Queste alterazioni comportano conseguenze immunologiche che possono spiegare l'elevata suscettibilità alle infezioni riportata in pazienti affetti da osteopetrosi [157].

Il mutante *oc/oc* rappresenta un buon modello per capire meglio la base cellulare della malattia e in parallelo per valutare nuovi approcci terapeutici che possono essere applicati alla clinica umana.

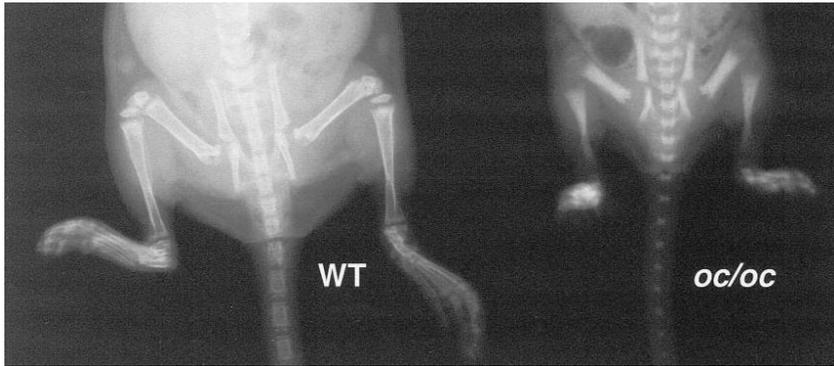


Figura 3. Osso osteosclerotico nel modello di topo *oc/oc*. Immagini radiografiche di un topo normale *wt* (a sinistra) e di uno osteosclerotico *oc/oc* (a destra). Si possono osservare il ritardo di crescita, l'aumento della densità ossea e le ridotte cavità midollari presenti nel modello *oc/oc* [156].

2. Materiali e Metodi

2.1 Reagenti

- *DMEM*: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma), 20% siero bovino fetale (FBS, BioWithttaker), 100 U/ml penicillina e streptomicina (P/S, 10000 U/ml penicillina e 10000 U/ml streptomicina, Lonza), 2 mM L-glutammina (200 mM in una soluzione 0.85% di NaCl, Lonza);
- *Terreno ES*: Knock out Dulbecco's Modified Eagle Medium (KO-DMEM, Gibco), 20% siero bovino fetale per cellule staminali embrionali (ES-FBS, Gibco), 100 U/ml P/S, 2 mM L-glutammina, β -mercaptoetanol (Gibco), 1X sodio piruvato (100X, Lonza), 1X aminoacidi non essenziali (100X, Gibco);
- *IMDM*: Iscove's Modified Eagle Medium (IMDM, Sigma), 2% FBS;
- *Terreno di congelamento*: 10% dimetil solfossido (DMSO, Sigma), 90% FBS;
- Fissativo di *Carnoy*: metanolo (Merck): acido acetico glaciale (Merck) 3:1;
- *MACS buffer*: 0.5 % siero bovino fetale (BSA, Merck), 2 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA, Fluxa) in 1X phosphate buffered saline (PBS, EuroClone);
- *TBST*: 20 mM Tris(idrossimetil)aminometano idrossicloridro (Tris-HCl, Fluxa) pH 7.4, 0.15 M NaCl (Merck), 0.05 % Tween-20 (Sigma);
- *Buffer di lavaggio*: 0.2% BSA, 0.05% Tween in 1X PBS;
- *Buffer di permeabilizzazione*: 5% FBS, 0.5% Triton (Sigma) in 1X PBS.

2.2. Procedure

2.2.1. Topi

I topi C57BL/6 CD45.1 tgOct4-GFP (green fluorescence protein) sono stati gentilmente forniti dal gruppo del Dr. Vania Broccoli. I topi *wt* C57BL/6 CD45.1, I topi *oc/oc* C57BL/6 CD45.1 e I topi nudi sono stati acquistati

presso Charles River. Il mantenimento degli animali e le procedure sperimentali sono state eseguite in conformità con le norme etiche del comitato di revisione istituzionale.

2.2.2. Colture cellulari

2.2.2.1. Isolamento dei fibroblasti embrionali di topo

I fibroblasti embrionali di topo (MEF) sono stati derivati da embrioni *wt* C57BL/6 CD45.1 E13.5. Essi sono stati raccolti in piastre di coltura da 100-mm contenenti PBS e sterilizzati con P/S diluita in PBS. La placenta, le teste e gli organi intraddominali sono stati scartati, mediante l'ausilio di forbici sterili. Gli organi rimanenti sono stati lavati in PBS, sminuzzati con forbici da dissezione e risospesi in 5 ml per embrione di Tripsina-EDTA (200 mg/L Versene (EDTA), 170000 U/L tripsina, Lonza). La sospensione è stata trasferita in tubi conici da 50 ml e incubata per 10 minuti a 37°C in un bagnetto riscaldante ad acqua. Gli aggregati cellulari sono stati dissociati in maniera vigorosa, mediante pipetta. La Tripsina-EDTA è stata inattivata con DMEM e la sospensione è stata filtrata usando un filtro a membrana con pori da 40 µm. Dopo aver centrifugato a 1500 rpm per 5 minuti, il pellet di cellule è stato risospeso in 1 ml DMEM per embrione e le cellule così ottenute sono state coltivate in piastre da coltura da 100-mm contenenti 7 ml di terreno DMEM completo e tenute in incubatore a 37°C e 5% di CO₂, fino al raggiungimento della confluenza. Sono state quindi trasferite in piastre da 150-mm e ulteriormente amplificate. Infine sono state distaccate mediante tripsina e centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti; il pellet così ottenuto è stato risospeso in 1 ml di terreno di congelamento per ciascuna cryovial.

2.2.2.2. Preparazione del substrato di cellule feeder

Le MEF sono state utilizzate come substrato di cellule nutritive per le iPSc dopo essere state inattivate con 10 µg/ml di Mitomicina C (Sigma) per tre ore. Le piastre in cui abbiamo coltivato le cellule sono state ricoperte con uno strato di soluzione di gelatina allo 0.1% (Gelatina di Tipo B ottenuta da pelle di bovino, Sigma). La soluzione di gelatina è stata ottenuta aggiungendo 500 mg di gelatina a 500 ml di acqua distillata ed è stata sterilizzata per filtrazione usando un filtro a membrana da 0.22 µm. La gelatina è stata riscaldata prima dell'uso, messa sulla piastra per qualche minuto e poi aspirata. Le piastre sono state lasciate aperte per farle asciugare completamente. Dopo tre ore di trattamento con Mitomicina C, le cellule MEF sono state lavate tre volte con PBS e incubate con Tripsina-EDTA da 5 a 10 minuti, raccolte, disgregate, centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti e quindi seminate nelle piastre trattate con gelatina (2500 cellule/cm²). Le cellule sono state incubate per una notte a 37 °C, 5% CO₂ prima di piastrarvi sopra le cellule iPSc.

2.2.2.3. Isolamento dei fibroblasti murini

I fibroblasti oc/oc sono stati ottenuti da biopsie caudali. Queste ultime sono state sterilizzate con P/S diluita in PBS e trasferite in piastre dove sono state sminuzzate con forbici da dissezione. Sono state quindi raccolte con 1.5 ml di DMEM, seminate in piastre da coltura da 35-mm e coltivate fino all'80% di confluenza, quindi trasferite in piastre da 100-mm, espanse e congelate.

2.2.3. Trasduzione

Le cellule sono state raccolte e contate. Circa $2 \cdot 10^5$ cellule sono state piastrate in piastre multi-well da 6 pozzetti e incubate per 6 ore. Il vettore lentivirale contenente i geni riprogrammanti (gentilmente fornito dal gruppo del Dr. Luigi Naldini) è stato aggiunto alle piastre alla molteplicità di infezione (MOI) indicata, con 4 ng/ml di polibrene (Sigma). Le cellule sono state incubate per una notte, dopodichè il terreno è stato sostituito e dopo altre 48 ore le cellule sono state raccolte e seminate su substrato nutritivo di MEF. Le cellule murine sono state piastrate con terreno per ESC con aggiunta di 10^3 U/ml di leukemia inhibitor factor (LIF, Millipore), aggiunto fresco ogni volta. Ogni giorno è stato cambiato metà del terreno.

2.2.4. Selezione delle cellule iPS

Dopo circa 4 settimane le colonie di cellule con morfologia simil-iPS sono state selezionate. 50 μ l di Tripsina-EDTA sono stati distribuiti in pozzetti di piastre da 96-well e con un puntale bagnato con la tripsina stessa le colonie sono state prelevate dal substrato di fibroblasti e trasferite nelle piastre. Dopo 10 minuti le cellule delle colonie disgregate sono state trasferite su un nuovo substrato di MEF in piastre da 24-well con terreno per ESC addizionato con LIF, al fine di espandere la coltura. Ogni giorno è stato cambiato metà del terreno. Quindi le cellule sono state trasferite in piastre da 6-well trattate con gelatina e contenenti MEF bloccate con Mitomicina e in seguito in piastre da 100-mm fino alla stabilizzazione della linea. Le cellule sono state congelate come descritto in precedenza.

2.2.5. Lipofezione

$2 \cdot 10^5$ cellule sono state seminate in una piastra da 6-well trattata con gelatina e contenente MEF inattivate con Mitomicina, in 2 ml di terreno per ESC senza P/S, ma addizionato di LIF e incubate per 4 ore.

Due tubi da microcentrifuga da 1.5 ml sono stati preparati con 100 μ l di Opti-MEM Reduced Serum Medium (Invitrogen) senza P/S e siero.

In un tubo sono stati aggiunti 2 μ g di DNA plasmidico contenente il cDNA della Cre ricombinasi (gentilmente fornito dal gruppo del Dr. Luigi Naldini), mentre nell'altro tubo sono stati aggiunti 6 μ g di Lipofectamina 2000 (Invitrogen) in rapporto 1:3 (pDNA:Lipofectamina 2000). I reagenti sono stati incubati per 5 minuti a RT, quindi sono stati mescolati e incubati 20 minuti a RT.

La sospensione così ottenuta è stata aggiunta alle cellule. Dopo una notte di incubazione a 37°C, 5% CO₂, è stato aggiunto terreno fresco per ESC addizionato di LIF. Dopo una settimana le cellule iPSc sono state sottoclonate ad una diluizione limite.

Esse sono state quindi tripsinizzate e lasciate 10 minuti in piastre Petri a bassa adesione, con 8 ml di terreno per ESC, al fine di separarle e purificarle dal substrato di MEF che, aderendo più velocemente delle iPSc, sono rimaste attaccate alla piastra nel momento del recupero.

Le iPSc sono state poi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti e piastrate in terreno per ESC più LIF, alla diluizione limite di 0.3 cellule per pozzetto, in piastre da 96-well trattate con gelatina, su substrato di MEF inattivate.

Il terreno è stato poi cambiato ogni giorno e le cellule sono state trasferite in nuove piastre di dimensioni diverse a seconda del numero di cellule.

2.2.6. Cariotipo

Le cellule iPS sono state coltivate in piastre da 100-mm e incubate con 0.1 µg/ml di Colcemid (0.1 µg/ml, Gibco) per due ore a 37°C, 5% CO₂, poi lavate con 2 ml di PBS e trattate con 2 ml di Tripsina-EDTA, quindi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato scartato delicatamente con un puntale e il pellet è stato risposeso nel rimanente volume. Quindi, 1 ml di una soluzione contenente KCl 75 mM (Fluxa), pre-riscaldato a 37, è stato aggiunto goccia a goccia, poi altri 7 ml della stessa soluzione sono stati aggiunti lentamente, nell'arco di 6 minuti. Le cellule sono state poi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti e, dopo aver eliminato il surnatante, è stato aggiunto goccia a goccia 1 ml di fissativo di Carnoy (preparato fresco ogni volta e congelato a -20°C). Il pellet è stato risospeso vigorosamente e 7 ml di fissativo di Carnoy è stato aggiunto goccia a goccia e lasciato per 45 minuti a -20°C. Le cellule sono state quindi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti e, dopo aver eliminato il surnatante, sono stati aggiunti lentamente 8 ml di fissativo. La sospensione cellulare è stata conservata per 30 minuti a -20°C e poi centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Le cellule sono state trattate con fissativo per altre 2 volte e infine il pellet è stato risospeso in un adeguato volume di fissativo. 20 µl di sospensione cellulare così ottenuta è stata depositata in due gocce su un vetrino Histo-bound (Marienfeld) che è stato poi lasciato per una notte a RT e quindi trattato con montante Vectashield, contenente 4,6-diamidino-2-phenylindone (DAPI). Il vetrino è stato visionato con un microscopio Olympus BX61, dotato di macchina fotografica CCD raffreddata, e le immagini sono state analizzate con il Software Applied Imaging CytoVision (CytoVision Master System with Karyotyping & FISH).

2.2.7. Tecnica FISH

La “Fluorescence in situ hybridization” (FISH) è una tecnica citogenetica che permette di localizzare la presenza di specifiche sequenze di DNA o cromosomi. I vetrini allestiti con il materiale ottenuto dalla preparazione citogenetica, conservata a -20°C (v. paragrafo precedente), sono stati pretrattati per 30 minuti a 37°C in 2XSSC (17,5g di NaCl e 8,2g di citrato trisodico in 1 litro di acqua distillata) e 0,3% NP-40 (SIGMA) a pH 7. Sono stati quindi deidratati mediante lavaggi successivi di 2 minuti ciascuno in etanolo a percentuali crescenti: 70%, 90% e 100%.

La miscela di ibridizzazione utilizzata è stata preparata con 7 µl di tampone, 2 µl di acqua distillata e 1 µl di sonda, marcata con uno specifico fluoroforo, e disposta su ogni vetrino. I vetrini sono stati quindi collocati nella macchina Hybridizer (S2450, DAKO) a 70°C per 1 minuto, per la co-denaturazione di sonda e vetrino e quindi lasciati in incubazione per l'ibridizzazione tra DNA della sonda e DNA del preparato citogenetico a 37°C, per un tempo variabile da 30 minuti a 1 ora. Al termine dell'incubazione, i vetrini sono stati lavati per 3 minuti in una soluzione di 2XSSC e 0,3% NP-40 a 70°C, quindi in una soluzione 2XSSC e 0,3% NP-40 a 60°C per 3 minuti e infine in una soluzione di PBS 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.

I vetrini, lasciati asciugare all'aria, sono stati poi contro-colorati con DAPI e in seguito osservati al microscopio a fluorescenza.

2.2.8. Purificazione delle iPSc dalle cellule feeder

Il terreno è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS e tripsinizzate. Le cellule raccolte sono state contate e centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti. 10^7 cellule sono state risospese in 80 µl di MACS buffer

e 20 µl di biglie anti-SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-4) (Miltenyi Biotec) e lasciate in incubazione per 15 minuti a 4°C, quindi lavate con 2 ml di buffer, centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti e risospese in 500 µl di buffer. Le cellule sono state poi caricate su colonne MS collocate nel campo magnetico di un separatore MACS. In questo modo le cellule marcate magneticamente con le biglie sono state trattenute sulla colonna e separate da quelle non marcate. Le cellule positive per SSEA-1 sono state quindi lavate per tre volte con 500 µl di buffer e, dopo averle tolte dal separatore, eluite in 1 ml.

2.2.9. “Real-time quantitative PCR”

Le iPSc sono state raccolte e centrifugate a 6000 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato lavato in PBS e centrifugato di nuovo e, dopo aver eliminato il surnatante, le cellule sono state conservate a -20°C.

Il DNA è stato estratto con QIAamp DNA Mini kit (Qiagen), seguendo le istruzioni indicate. In breve, il pellet è stato risospeso in 200 µl di PBS, 20 µl Proteinase K e 200 µl di buffer AL e incubato per 10 minuti a 56°C. Alla sospensione sono stati poi aggiunti 200 µl di etanolo 100% (Merck) e trasferito su colonne. Le colonne sono state quindi lavate con 500 µl di buffer AW1 e buffer AW2. Il campione è stato centrifugato a 13200 rpm per tre minuti. Il DNA è stato eluito in 200 µl di acqua e conservato a -20°C. La Real-time quantitative PCR è stata eseguita con i primer e le sonde elencate nella Tabella 1.

Beta actin	Forward primer	AGAGGGAAATCGTGC GTGAC
	Reverse primer	CAATAGTGACCTGGCCGT
	Probe VIC-TAMRA	CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC
Lentiviral vector (LV)	Forward primer	TACTGACGCTCTCGCACC
	Reverse primer	TCTCGACGCAGGACTCG
	Probe FAM-MGB	ATCTCTCTCCTTCTAGCCTC

Tabella 1. Sequenze e concentrazioni dei primer utilizzati nelle real-time quantitative PCR. La Beta actina è stata usata per amplificare il DNA genomico, mentre l'LV per amplificare il DNA virale.

Tutti i campioni sono stati collocati in piastre di reazione da 96-well FAST Optical (PE Applied Biosystem) in duplicato, con entrambe le miscele di real-time PCR elencate nella Tabella 2. Come controllo negativo è stata utilizzata acqua.

A

Reagenti	Concentrazione iniziale	Volume per campione
Master Mix	2X	12 μ l
Forward primer	10 μ M	1 μ l
Reverse primer	10 μ M	1 μ l
Sonda	5 μ M	1 μ l
DNA + H ₂ O		10 μ l
Volume totale		25 μ l

B

Reagenti	Concentrazione iniziale	Volume per campione
Master Mix	2X	12.5 μ l
Forward primer	10 μ M	0.75 μ l
Reverse primer	10 μ M	0.75 μ l
Sonda	5 μ M	1 μ l
DNA template		10 μ l
Volume totale		25 μ l

Tabella 2. Componenti delle miscele per la real-time quantitative PCR. (A) Miscela per l'amplificazione del DNA genomico e (B) per l'amplificazione del DNA virale.

La reazione di Real-time quantitative PCR è stata effettuata mediante il sistema di rilevazione di sequenze ABI PRISM Taqman 7900 HT (PE Applied Biosystem), programmato come in Tabella 3.

Temperatura	Tempo	# cicli
50°C	2'	1
95°C	15'	1
95°C	30''	40
60°C + 0.1°C/ciclo	1'	

Tabella 3. Impostazioni termiche della real-time quantitative PCR.

Le analisi sono state fatte con il Software SDS (PE Applied Biosystem). La quantità di DNA di vettore integrato è stata valutata in rapporto a curve standard, derivate da diluizioni seriali di DNA murino di splenociti per valutare il DNA genomico e da una linea trasdotta con un numero noto di copie di vettore integrate per valutare il VCN. Per ottenere i campioni per le curve standard LV, una linea cellulare è stata trasdotta con il vettore lentivirale. Le curve standard sono state considerate accettabili se il loro coefficiente di regressione (R^2) risultava maggiore di 0.98, i coefficienti di variazione tra i duplicati inferiori al 20% e i controlli negativi con valori di amplificazione (Ct, cycle threshold) maggiori di 38.

2.2.10. “Real-time quantitative RT-PCR”

L'RNA è stato estratto mediante trizolo. 1 ml di TRIzol Reagent (EUROzol, EuroClone) è stato aggiunto alle cellule, lisando con l'aiuto di una pipetta e incubando a RT per 5 minuti. 200 µl di cloroformio (AnalaR) sono stati aggiunti mescolando vigorosamente e lasciati per tre minuti a RT, quindi centrifugati a 12000 g per 15 minuti a 4°C.

Le proteine e il DNA sono precipitate con il Cloroformio, mentre l'RNA è rimasto nella fase acquosa superiore che è stata recuperata. A quest'ultima sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo (Merck) e lasciato incubare per 10 minuti a RT. Il campione è stato centrifugato a 12000 g per 15 minuti a 4°C. Dopo aver eliminato il surnatante, è stato aggiunto 1 ml di etanolo 75% , risospeso bene e centrifugato a 7500 g per 5 minuti a 4°C. Il pellet di RNA è stato fatto asciugare completamente all'aria, risospeso in 50 µl di acqua RNase-free e incubato a 55°C per 10 minuti, dopodichè è stato quantificato al Nanodrop.

1 µg di RNA è stato retrotrascritto mediante il Kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), seguendo le istruzioni indicate. Il cDNA è stato conservato a -20°C. Sybr green based real-time RT-PCR è stata eseguita con i primer e le sonde elencate nella Tabella 4. I campioni sono stati piastrati in duplicato.

Beta actin	Forward primer	AGTGTGACGTTGACATCCGT	400 nM
	Reverse primer	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA	400 nM
c-Myc	Forward primer	AGAGCTCCTCGAGCTGTTTG	600 nM
	Reverse primer	TTCTCTTCTCGTCGCAGAT	600 nM
Utf1	Forward primer	CTGGCTGCGGAAAATGAC	600 nM
	Reverse primer	GGGAGGATTCTGAAGGTATGG	600 nM
Gdf3	Forward primer	ACCTTTCCAAGATGGCTCCT	600 nM
	Reverse primer	CCTGAACCACAGACAGAGCA	600 nM
Zfp42	Forward primer	GCGGTGTGTACTGTGGTGTC	600 nM
	Reverse primer	AGTTTCGAGCTCTCCGTGAA	600 nM
Lin28	Forward primer	GTCTTTGTGCACCAGAGCAA	600 nM
	Reverse primer	CTTTGGATCTTCGCTTCTGC	600 nM
Klf4	Forward primer	CTGAACAGCAGGGACTGTCA	600 nM
	Reverse primer	GTGTGGGTGGCTGTTCTTTT	600 nM
Sox2	Forward primer	GATGCACAACCTCGGAGATCAG	400 nM
	Reverse primer	TTTATAATCCGGGTGCTCCTT	400 nM
Oct4	Forward primer	CTGCAGAAGGAGCTAGAACAGTTTG	400 nM
	Reverse primer	GATGGTGGTCTGGCTGAACAC	400 nM
Nanog	Forward primer	GATGCGGACTGTGTTCTCTC	400 nM
	Reverse primer	GCTTGCACCTTCATCCTTTGG	400 nM

Tabella 4. Sequenze e concentrazioni dei primer utilizzati per la real-time quantitative RT-PCR..

Tutti i campioni sono stati piastrati in duplicato in piastre FAST Optical da 96-well con la miscela di real-time PCR indicata in Tabella 5.

Per le reazioni sono stati usati 30 ng di cDNA per ciascun campione diluiti in 5 μ l di acqua. Come controllo negativo è stata usata acqua.

Reagenti	Volume per campione
2X PCR Master Mix	10 μ l
forward primer	v. Tabella 4
reverse primer	v. Tabella 4
30 ng cDNA	5 μ l
Acqua DNase-free	A 20 μ l

Tabella 5. Componenti della miscela per la real-time quantitative RT-PCR.

La reazione di Real-time RT-PCR è stata effettuata con il Sistema di rilevazione ABI PRISM Taqman 7900 HT, impostando il programma standard con 39 cicli.

Il metodo $\Delta\Delta$ Ct è stato usato per la quantificazione. Il Δ Ct è stato calcolato per ciascun campione (E14, HM1, MEFs, iPSc) sottraendo i valori medi di Ct derivati dall'amplificazione con i primer per β actina dai valori medi derivati dall'amplificazione con i primers dei vari geni della pluripotenza. In questo modo il Ct è stato normalizzato sull'espressione del gene housekeeping. Il $\Delta\Delta$ Ct di ciascun gene della pluripotenza è stato calcolato sottraendo i valori di Δ Ct delle MEF da quelli delle E14, delle Hm1 o delle iPSc. In questo modo abbiamo ottenuto l'espressione dei geni di E14, HM1 e iPS E14 confrontate con l'espressione basale delle MEF.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct medio}_{\text{geni}} - \text{Ct medio}_{\text{beta actina}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{E14}} - \Delta\text{Ct}_{\text{MEFs}} \quad \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{iPSc}} - \Delta\text{Ct}_{\text{MEFs}}$$

$$\text{Valori negli istogrammi} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

2.2.11. Saggio della fosfatasi alcalina

Le iPSc sono state coltivate in piastre da 6-well trattate con gelatina, su MEF inattivate con mitomicina. Il terreno è stato aspirato e le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% (PFA, Sigma) per 2 minuti e lavate con TBST. I reagenti Fast Red Violet (FRV), Naphthol AS-BI phosphate del kit 'Alkaline Phosphatase Detection' (Millipore) e acqua sono stati mescolati in rapporto 2:1:1 (FRV:Naphthol:acqua). La soluzione ottenuta è stata aggiunta alle cellule e incubata al buio per 15 minuti a RT. E' stato aggiunto TBST per lavare le cellule, poi sostituito con PBS.

Le colonie che esprimevano l'enzima hanno assunto una colorazione rossa.

2.2.12. Immunocitochimica

Immunocitochimica: Le iPSc, le E14 o le HM1 sono state coltivate con feeder di cellule MEFs, su vetrini trattati con gelatina e posti in piastre da 24-well, fino al raggiungimento della confluenza desiderata. In seguito le cellule sono state lavate con PBS, fissate con PFA al 4% per 15 minuti al buio, lavate 2 volte con washing buffer, permeabilizzate e bloccate con perm buffer per un'ora a RT. Le cellule sono state poi lavate con washing buffer, dopodichè gli anticorpi primari sono stati aggiunti alle concentrazioni descritte in Tabella 6 e incubati overnight at 4°C. Il giorno successivo, dopo 3 lavaggi in washing buffer, sono stati aggiunti gli anticorpi secondari alle diluizioni indicate in Tabella 6 e lasciati incubare per un'ora a RT. Dopo 4 lavaggi è stato aggiunto DAPI, diluito 1:50000 in acqua, per 5 minuti a RT.

Le cellule sono state poi lavate con acqua e lasciate asciugare all'aria.

I vetrini con le cellule sono stati prelevati e collocati su supporti Histo-bound con 5 µl di mezzo montante. Dopo 30 minuti a RT al buio, i vetrini sono stati posti a -20°C. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale Olympus FluoView1000.

Rabbit anti-Nanog	Novus Biologicals	1:100
Rabbit anti-Sox2	Abcam	1:200
Rabbit anti-Oct4	Abcam	1:200
Mouse anti-SSEA-1	Cell signaling	1:200
Goat anti-rabbit FITC conjugated	Abcam	1:2000
Goat anti-mouse FITC conjugated	Abcam	1:2000

Tabella 6. Anticorpi utilizzati per l'immunoistochimica.

2.2.13. Saggio di formazione dei teratomi

Le iPSc sono state tripsinizzate, separate dalle MEFs e contate. $5 \cdot 10^6$ cellule sono state risospese in 100 µl di PBS e caricate in una siringa per iniezione. Ciascun topo nudo ha ricevuto una iniezione sottocutanea su ciascun fianco. Dopo circa 4 settimane i tumori cresciuti nel sito di iniezione sono stati raccolti. I noduli sono stati separati dagli altri tessuti, lavati in PBS, fissati con PFA al 4% e inclusi in paraffina per le successive analisi effettuate dal gruppo del Dr. Scanziani (Dipartimento di Patologia dell'Università di Milano).

3. RISULTATI

3.1. Generazione di cellule iPS

3.1.1. Generazione di cellule iPS murine wt

3.1.1.1 Vettori lentivirali di terza generazione

I fibroblasti murini che abbiamo riprogrammato per generare le iPSc, sono stati ottenuti da embrioni di 13.5 giorni di topi maschi C57BL/6 CD45.1 tgOct4-GFP. Questi topi contengono il transgene GFP sotto il controllo del promotore di Oct4.

In questo modo, quando durante la fase di riprogrammazione è stata indotta l'espressione endogena di Oct4, è stata espressa anche la GFP che ci ha permesso di individuare precocemente le cellule somatiche divenute pluripotenti, grazie all'uso del microscopio a fluorescenza.

In un primo set di esperimenti, sono stati utilizzati 2 vettori lentivirali (LV) policistronici auto-inattivanti di terza generazione, uno codificante per Oct4/Sox2 e l'altro per Oct4/Klf4, sotto il controllo del promotore virale SFFV (spleen focus-forming virus) (Figura 4).

Il promotore dei vettori lentivirali è stato inattivato generando una sequenza troncata U3(Δ U3) in cui è stato inserito un sito loxP. Dopo il promotore SFFV sono stati collocati i transgeni, separati da sequenze peptidiche 2A, inserite per consentire l'espressione individuale delle proteine.

A valle dei transgeni, alla fine dei vettori, è stato collocato l'elemento regolatore post-trascrizionale WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus), al fine di migliorare l'espressione genica e il titolo virale. Il transgene Oct4 è stato inserito in entrambi i vettori per migliorare il livello trascrizionale, in quanto questo gene è stato descritto come il più importante per la riprogrammazione.

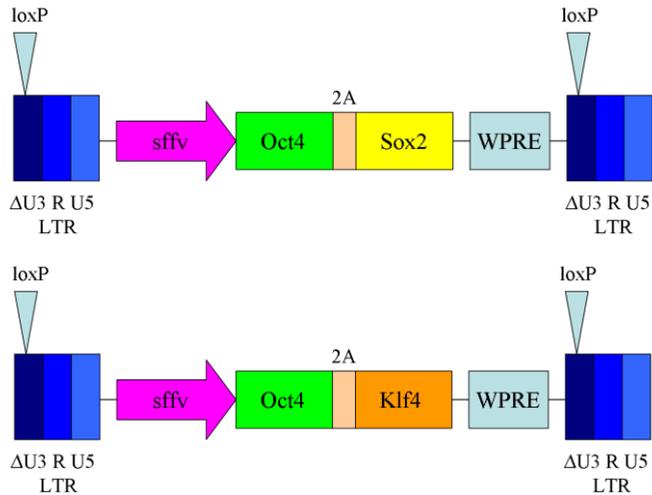


Figura 4. Schema dei vettori LV policistronici. I 2 vettori lentivirali contenenti il cDNA di Oct4 e Sox2 (in alto) e il cDNA di Oct4 e Klf4 (in basso). 2A indica la sequenza peptidica 2A, LTR indica le lunghe ripetizioni terminali.

I fibroblasti embrionali (2×10^5 cellule) sono stati trasdotti con i succitati vettori lentivirali a diverse concentrazioni di p24, partendo da 200 ng iniziali e continuando con diluizioni seriali fino ad una quantità finale di 12,5 ng.

Il dosaggio della proteina p24, proteina propria del rivestimento capsidico del virus HIV, è il parametro utilizzato per indicare la concentrazione delle particelle virali totali, comprendenti sia le unità trasducenti aventi al loro interno i transgeni, sia le particelle vuote, prive di genoma, nella sospensione testata.

Il rapporto tra titolo virale e concentrazione della proteina è indice della qualità della preparazione virale.

Dopo 2 giorni dalla trasduzione, il terreno è stato sostituito con ES medium e aggiunta di LIF, una combinazione adeguata alle condizioni di coltura delle cellule staminali pluripotenti, in grado di mantenerne la staminalità.

Colonie iPS, individuate sulla base della loro morfologia simil-ES, sono iniziate a comparire 4 settimane dopo la trasduzione. Sono state quindi raccolte e fatte crescere su un substrato nutritivo di cellule MEF, in precedenza bloccate con Mitomicina C per sostenere la crescita delle cellule iPS. Periodicamente, quando raggiungevano l'80% di confluenza, le cellule riprogrammate venivano trattate con tripsina e ripiastrate, fino al raggiungimento della stabilità della coltura.

L'efficienza di riprogrammazione è risultata diversa a seconda della quantità di p24 utilizzata, benchè siano state ottenute colonie iPS per ciascuna condizione, come riportato nelle Tabella 10.

p24 (ng)	# of iPS colonies	Efficiency of reprogramming
12.5	23	0.01%
25	15	0.008%
50	2	0.001%
100	2	0.001%
200	1	0.0005%

Tabella 10. Cellule iPS derivate da fibroblasti embrionali di topo trasdotti con diverse quantità di p24. Nella seconda colonna è indicato il numero di colonie iPS ottenute dai differenti protocolli di trasduzione. L'efficienza di riprogrammazione è stata calcolata come rapporto tra il numero totale di colonie ottenute e quello delle cellule iniziali trasdotte.

Come atteso in base ai dati presenti in letteratura, tutte le condizioni sperimentali utilizzate hanno fornito dei valori di efficienza di riprogrammazione molto bassi, benchè una resa maggiore sia stata ottenuta in corrispondenza delle concentrazioni più basse di particelle virali, probabilmente a causa degli effetti tossici delle quantità più elevate di vettori lentivirali.

Alcuni cloni sono stati selezionati e il loro DNA è stato analizzato mediante real-time quantitative PCR, per valutare il numero di copie di vettore integrate.

I risultati, raccolti nella Tabella 11, mostrano una accentuata variabilità, con valori di VCN totalmente indipendenti dalle concentrazioni di vettore di riprogrammazione utilizzate, probabilmente dovuta alla presenza di cellule MEF nella coltura.

iPS clones	VCN
12.5 ng p24 #1	2.80
12.5 ng p24 #3	0.29
12.5 ng p24 #5	2.80
12.5 ng p24 #8	0.65
12.5 ng p24 #9	0.83
12.5 ng p24 #10	0.66
25 ng p24 #2	0.94
25 ng p24 #3	0.34
25 ng p24 #7	0.99
50 ng p24 #2	1.60

Tabella 11. VCN delle colonie iPS. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR. In grassetto sono indicati i cloni che sono stati ulteriormente caratterizzati.

In seguito abbiamo analizzato la distribuzione numerica dei cromosomi di alcuni cloni, al fine di valutare la presenza di possibili alterazioni genomiche indotte dalle procedure di riprogrammazione, dall'utilizzo della tripsina durante la coltivazione delle cellule o dall'elevata frequenza di duplicazione.

I risultati raccolti nella Tabella 12 sono espressi come percentuale di metafasi con 40 cromosomi (il normale numero di cromosomi presenti nel genoma diploide murino).

La distribuzione delle cellule in coltura è stata considerata normale se la percentuale di metafasi con una normale distribuzione dei cromosomi risultava maggiore del 65%.

iPS clones	% normal distribution of chromosomes
12.5 ng p24 #5	33%
12.5 ng p24 #6	36%
12.5 ng p24 #7	40%
12.5 ng p24 #10	63%
25 ng p24 #5	25%
50 ng p24 #2	71%

Tabella 12. Analisi della distribuzione numerica dei cromosomi. Percentuali di metafasi con una normale distribuzione di cromosomi tra tutte le metafasi analizzate di diversi cloni iPS. In grassetto i cloni ulteriormente caratterizzati.

Solo uno dei sei cloni iPS analizzati ha mostrato una percentuale accettabile di metafasi normali, mentre la maggior parte dei cloni presentava metafasi con un alto numero di cromosomi, che andavano da 41 a più di 100. E' stato osservato, inoltre, un grande numero di riarrangiamenti (Figura 5, pannello A).

I cloni iPS 12.5 ng p24 #10 e iPS 50 ng p24 #2, che presentavano una migliore distribuzione cromosomica, sono stati scelti per procedere con la caratterizzazione (Figura 5, pannello B).

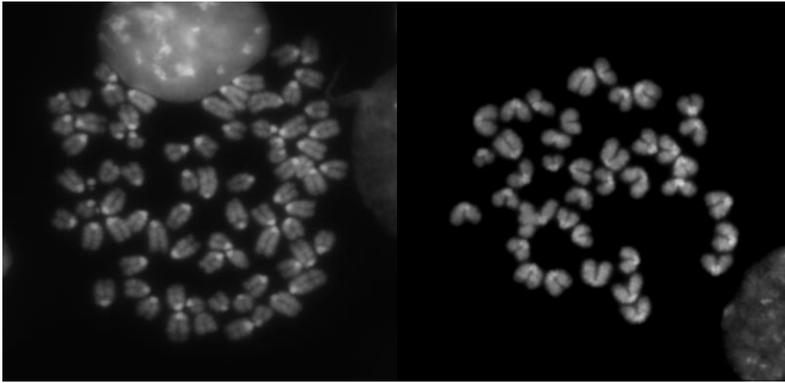
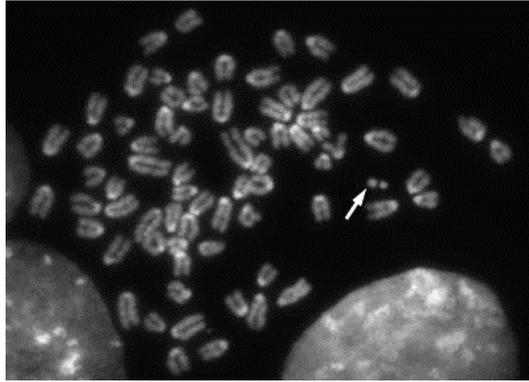
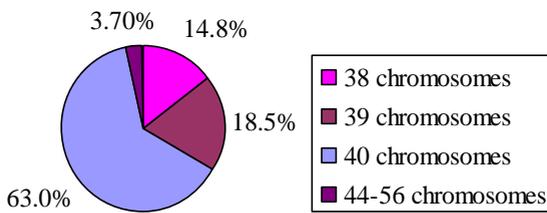
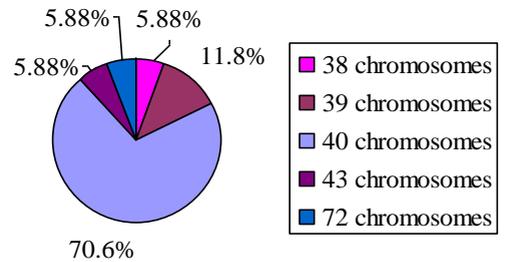
A**B****iPSc 12.5 ng p24 #10****iPSc 50 ng p24 #2**

Figura 5. Distribuzione numerica dei cromosomi dei cloni iPSc. (A) Metafasi con un numero di cromosomi normale (pannello in basso a destra) ed elevato con presenza di riarrangiamenti (pannello in alto e in basso a sinistra) indicati dalla freccia. (B) Distribuzione percentuale del numero di cromosomi nelle metafasi dei cloni selezionati.

3.1.1.2 Eliminazione dei vettori lentivirali

I vettori lentivirali utilizzati sono fiancheggiati da siti loxP per permettere l'eliminazione dei vettori dal genoma, grazie all'espressione transiente della Cre ricombinasi. Questo enzima è stato introdotto nelle cellule riprogrammate mediante lipofezione di un plasmide contenente il suo cDNA sotto il controllo del promotore EF1A (Figura 6).

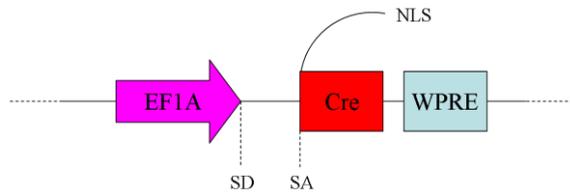


Figura 6. Rappresentazione del plasmide contenente la Cre ricombinasi. Immagine rappresentante parte del plasmide contenente il cDNA della Cre. Sono presenti i siti splice donor (SD) e splice acceptor (SA), insieme al sito di localizzazione nucleare (NLS) e al WPRE.

I due cloni selezionati come migliori, sono stati trattati con la Cre ricombinasi, come appena descritto, e dopo una settimana è stato valutato il loro VCN: i valori ottenuti sono risultati più bassi rispetto alle condizioni iniziali, con una diminuzione da 0.66 a 0.11 e da 1.57 a 0.39 per i 2 cloni 12.5 ng p24 #10 e 50 ng p24 #2 rispettivamente.

iPS clones	VCN
12.5 ng p24 #10	0.11
50 ng p24 #2	0.39

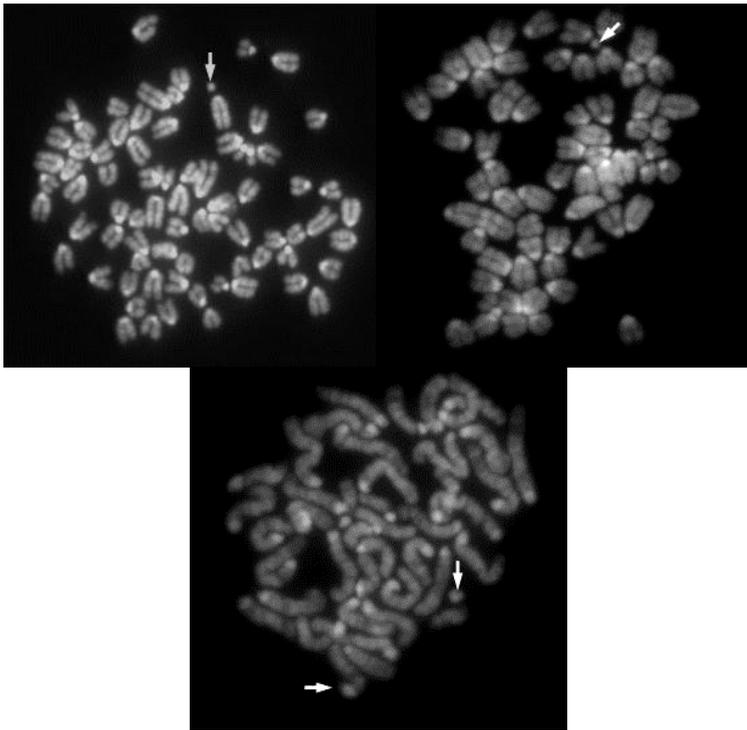
Tabella 13. Valori di VCN valutati dopo il trattamento con la Cre ricombinasi. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR.

Per isolare cloni iPS senza vettori integrati e con un normale set di cromosomi, le colonie sono state dissociate e sotto-clonate ad una diluizione limite di 0.5 cellule/pozzetto, concentrazione tale da fornire una buona probabilità di isolare cloni effettivamente derivanti da singola cellula, anche se con una efficienza di clonaggio più bassa. Procedendo in questo modo abbiamo ottenuto 5 sotto-cloni dal clone 12.5 ng p24 #10 e 12 sotto-cloni dal clone 50 ng p24 #2, dei quali è stato nuovamente misurato il VCN, sempre mediante real-time quantitative PCR (Tabella 14). Il sotto-clone 12.5 ng p24 #10 'd', che è risultato praticamente privo di copie di vettore integrato, è stato ulteriormente analizzato per valutarne la distribuzione numerica dei cromosomi. Nonostante il basso VCN, solo il 6.7% delle metafasi presentava un normale numero di cromosomi, con presenza di riarrangiamenti (Figura 7). In conclusione, questo clone è stato scartato, in quanto risultato troppo anomalo dal punto di vista genetico.

12.5 ng p24 #10	VCN	50 ng p24 #2	VCN
A	0.090	A	4.17
B	0.030	B	n.d.
C	0.012	C	5.06
D	0.00016	D	5.85
E	0.010	E	2.28
		F	2.10
		G	1.84
		H	2.31
		I	2.61
		L	2.92
		M	2.35
		N	2.48

Tabella 14. Valutazione del VCN nei sotto-cloni iPS. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR. In grassetto sono indicate i cloni ulteriormente caratterizzati.. n.a.= non disponibile

A



B

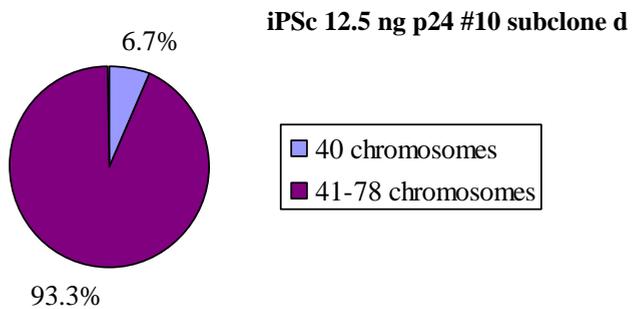


Figura 7. Analisi delle metafasi del sotto-clone 12.5 ng p24 #10 d. (A) Esempi di metafasi riarrangiate. (B) Distribuzione delle percentuali del numero di cromosomi nelle metafasi del sotto-clone selezionato.

3.1.1.3 Utilizzo di un solo vettore lentivirale policistronico di terza generazione per la derivazione di cellule iPS murine wt.

Per diminuire il rischio di alterazioni genomiche nelle iPSc, dovuto all'utilizzo di due vettori, abbiamo deciso di trasferire i geni riprogrammanti usando un singolo vettore LV policistronico auto-inattivante di terza generazione, codificante tutti e tre i transgeni (Oct4, Sox2 e Klf4) sotto il controllo del promotore SFFV.

Oct4 è stato inserito come primo gene per aumentarne l'efficienza trascrizionale. Come per i precedenti vettori, la cassetta policistronica è stata eliminata dopo la riprogrammazione, grazie alla presenza delle sequenze loxP collocate in corrispondenza delle LTR del vettore. Anche in questo caso i geni riprogrammanti sono stati separati da sequenze peptidiche 2A, ma a differenza dei precedenti lentivirus, il secondo peptide è stato ricodificato, al fine di evitare la presenza di sequenze identiche nel vettore che avrebbero potuto dare ricombinazione interna.

Alla fine del vettore, a valle dei transgeni, è stato collocato anche in questo caso l'elemento regolatore WPRE (Figura 8).

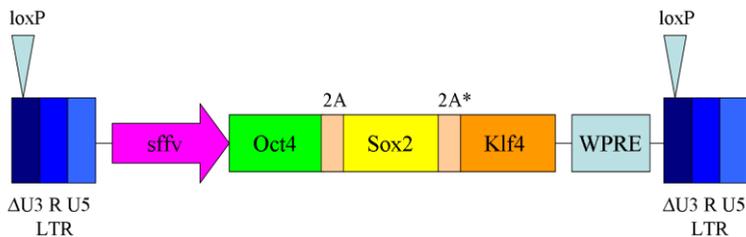


Figura 8. Vettore lentivirale policistronico di terza generazione. Vettore lentivirale utilizzato, contenente il cDNA di Oct4, Sox2 e Klf4. 2A* indica la sequenza peptidica 2A ricodificata.

Fibroblasti di embrioni di 13.5 giorni di topi maschi C57BL/6 CD45.1 (2×10^5 cellule) sono stati trasdotti con questo vettore ad una MOI pari ad 1. Dopo 48 ore il terreno contenente il vettore è stato sostituito con un medium specifico per ES, poi utilizzato per le successive 4 settimane per mantenere le cellule in coltura, fino alla comparsa di colonie iPS, che sono state selezionate e raccolte sulla base della loro morfologia simil-staminale. Abbiamo in questo modo ottenuto nove diverse linee iPS, indicative di una efficienza di riprogrammazione dello 0.0045%, stimata come rapporto tra il numero delle linee iPS riprogrammate e il numero di cellule infettate.

Ciascun clone è stato testato mediante real-time quantitative PCR per calcolare il VCN, e analizzato dal punto di vista della distribuzione cromosomica; questa analisi ha fornito valori di VCN compresi tra 0.34 to 0.50 e una buona percentuale di metafasi con un normale set di cromosomi in soli 4 cloni iPS (Tabella 15, figura 9).

Sulla base di questi risultati i cloni wt iPSc #1, wt iPSc #5 and wt iPSc #6 sono stati selezionati per le successive analisi. Il clone wt iPSc #9 non è stato scelto a causa dell'elevato numero di riarrangiamenti cromosomici presenti.

iPS clones	VCN	% normal distribution of chromosomes
wt iPSc #1	0.34	65%
wt iPSc #2	n.d.	65%
wt iPSc #3	n.d.	62%
wt iPSc #4	n.d.	36%
wt iPSc #5	0.50	78%
wt iPSc #6	0.40	72%
wt iPSc #7	n.d.	22%
wt iPSc #9	0.48	55%
wt iPSc #11	n.d.	37%

Tabella 15. VCN e analisi della distribuzione numerica dei cromosomi nelle iPS wt. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR. In grassetto i cloni ulteriormente caratterizzati. n.d. = non disponibile.

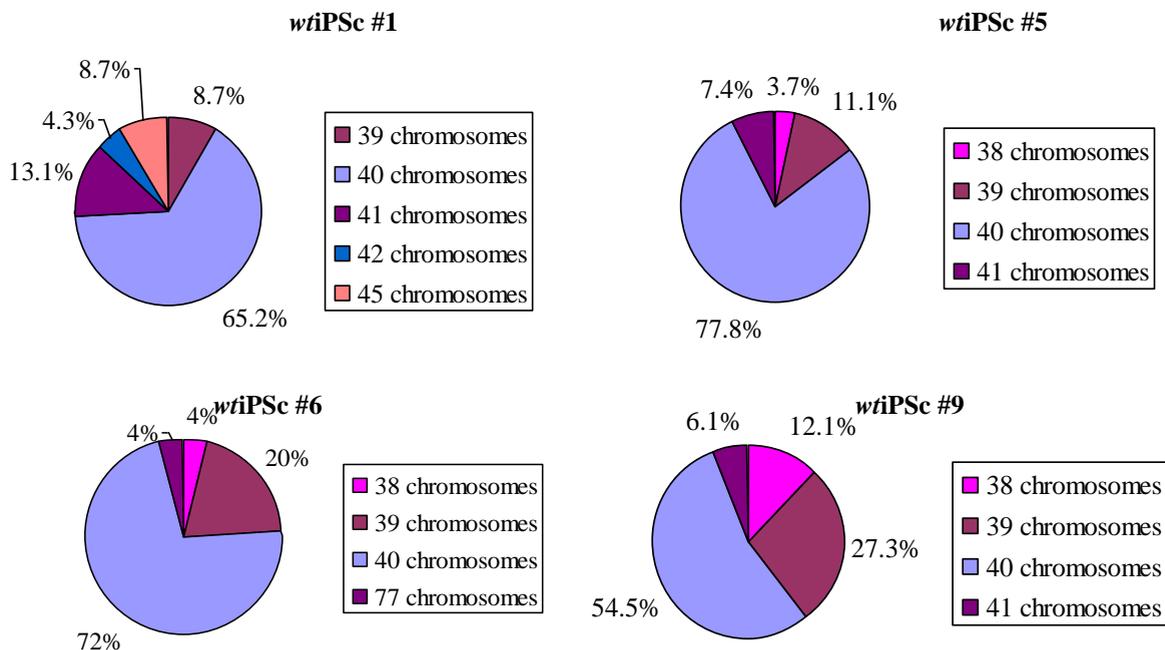


Figura 9. Analisi della distribuzione numerica dei cromosomi nelle iPS wt.

Distribuzioni percentuali del numero dei cromosomi nelle metafasi dei cloni selezionati.

3.1.1.4 Eliminazione del vettore lentivirale policistronico

I cloni scelti sono stati trattati con Cre ricombinasi secondo la modalità descritta in precedenza (Fig 14) e una settimana dopo il trattamento sono stati valutati i valori di VCN (tabella 16).

iPS clones	VCN
<i>wt</i> iPSc #1	0.21
<i>wt</i> iPSc #5	0.20
<i>wt</i> iPSc #6	0.20

Tabella 16. Valori di VCN valutati dopo il trattamento con Cre ricombinasi. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR.

Nonostante nessuno dei cloni abbia mostrato un valore di VCN vicino allo zero, abbiamo proceduto al loro sotto-clonaggio, piastrando le cellule ad una diluizione limite di 0,3 cellule/pozzetto per essere sicuri di avere cloni originatisi a partire da singola cellula. A seconda della diverse efficienze di sottoclonaggio, sono stati ottenuti numeri variabili di sottocloni: in particolare, sedici dal clone *wt* iPSc #1, 47 dal *wt* iPSc #5 e 25 dal *wt* iPSc #6 (Tabella 17).

Alcuni dei cloni con valori di VCN più bassi sono stati analizzati per la distribuzione cromosomica.

Il sottoclone #6.25 è stato scelto sulla base del profilo di distribuzione cromosomica per essere ulteriormente analizzato, nonostante l'elevato VCN (Figura 10).

<i>w<i>t</i>i</i> PSc #1	VCN	<i>w<i>t</i>i</i> PSc #5	VCN	<i>w<i>t</i>i</i> PSc #6	VCN	% normal distribution of chromosomes
1	0.36	1	12.4	20	1.2	33%
2	0.34	2	15.0	22	0.06	74%
3	0.38	3	20.5	23	0.31	10%
4	0.33	4	15.2	24	0.42	76%
5	0.26	5	14.1	25	0.22	90%
6	0.19	6	38.3	26	0.35	59%
7	0.32	7	16.2	28	0.31	n.a.
8	0.31	8	74.7	29	0.29	43%
9	0.38	9	17.6	30	0.31	n.d.
10	0.35	10	19.2	31	0.24	n.d.
11	0.27	11	20.0	32	0.32	n.d..
12	0.29	12	12.3	33	0.37	n.d..
13	0.24	13	27.6	35	0.26	n.d.
14	0.36	14	25.5	36	0.21	n.d.
15	0.26	15	13.0	37	0.31	n.d.
16	0.47	16	31.3	38	0.05	50%
		17	13.0	39	0.29	n.d.
		18	25.4	40	0.35	n.d.
		19	23.0	41	0.27	n.d.
		20	13.4	42	0.45	n.d.
		25	3.20	43	0.11	n.d.
		26	0.0025	45	0.26	n.d.
				46	0.32	n.d.
				48	0.56	n.d.
				49	0.30	n.d.

Tabella 17. VCN e analisi della distribuzione cromosomica delle iPS *w*t dopo trattamento con Cre.** Il VCN è stato analizzato mediante real-time quantitative PCR. In grassetto i cloni ulteriormente caratterizzati. n.d. = non disponibile. Invece, i sottocloni #6.22 e #6.38 presentavano valori di VCN più bassi, ma una percentuale di metafasi con un normale numero di cromosomi, del 74% e 50% rispettivamente.

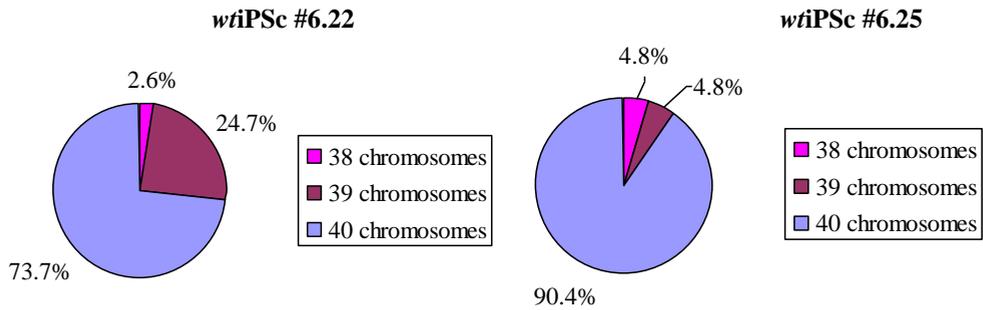


Figura 10. Distribuzione numerica dei cromosomi dei cloni iPS wt. Distribuzioni percentuali del numero di cromosomi nelle metafasi dei cloni scelti.

Il clone iPS wt #6.25 è stato trasfettato una seconda volta con Cre ricombinasi per far diminuire il valore del suo VCN e successivamente di nuovo sottoclonato per ottenere linee da singola cellula, prive di vettore integrato e con un normale profilo cromosomico.

In questo modo abbiamo ottenuto 46 sottoclone che sono stati quindi analizzati per VCN. Di questi, i 17 che presentavano bassi valori di VCN, sono stati analizzati per valutarne la distribuzione cromosomica (Tabella 18).

I sottoclone wt #6.25.39 e #6.25.68 sono risultati privi di copie di vettore integrate e con più del 77% di metafasi normali (Figura 11) e sono stati quindi scelti per essere ulteriormente analizzati.

<i>w</i> iPSc #6.25	VCN	% normal distribution of chromosomes
1	0.06	8%
2	n.a.	80%
3	16.6	n.d.
4	0.04	45%
6	0	41%
7	14.7	n.d.
8	14.5	n.d.
9	18.6	n.d.
10	18.3	n.d.
11	13.3	n.d.
12	15.0	n.d.
14	18.0	n.d.
19	19.4	n.d.
20	23.0	n.d.
21	15.4	n.d.
22	18.0	n.d.
25	0.08	n.d.

<i>w</i> iPSc c	VCN	% normal distribution
26	16.5	42%
28	0.13	n.d.
31	0	69%
36	0.0009	4%
38	0	56%
39	0	83%
42	0.0003	44%
46	20.0	n.d.
50	n.a.	52%
51	0.087	n.d.
52	0.55	n.d.
54	0.0055	72%
65	0.039	64%
66	10.6	n.d.
67	0	56%
68	0.0001	78%

Tabella 18. VCN e analisi della distribuzione cromosomica delle iPS *w*t dopo il secondo trattamento con Cre. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR. In grassetto i cloni ulteriormente caratterizzati. n.d. = non disponibile.

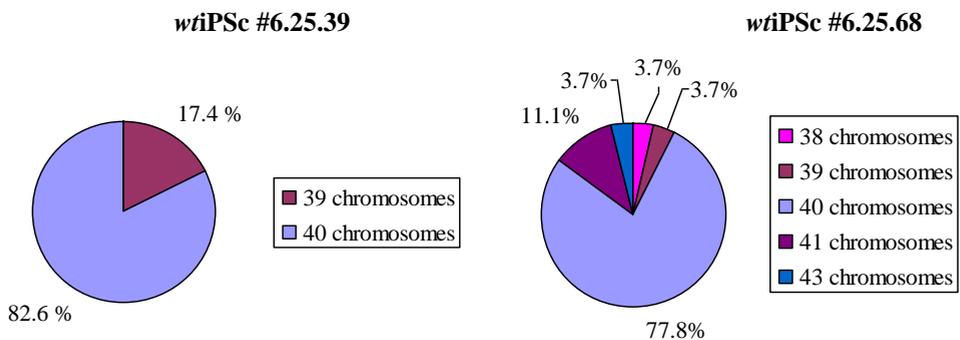


Figura 11. Distribuzione numerica dei cromosomi dei cloni iPS *w*t. Distribuzioni percentuali del numero di cromosomi nelle metafasi dei cloni iPS *w*t #6.25.39 e #6.25.68.

3.1.1.5 Caratterizzazione dei cloni iPSc

L'espressione della fosfatasi alcalina è considerato un marker di pluripotenza, per questo i due cloni iPSc *wt* #6.25.39 e #6.25.68 sono stati testati per valutare l'espressione di questo enzima. In Figura 12 si può vedere come i livelli di proteina dei due cloni risultino elevati in confronto al substrato di cellule MEF.

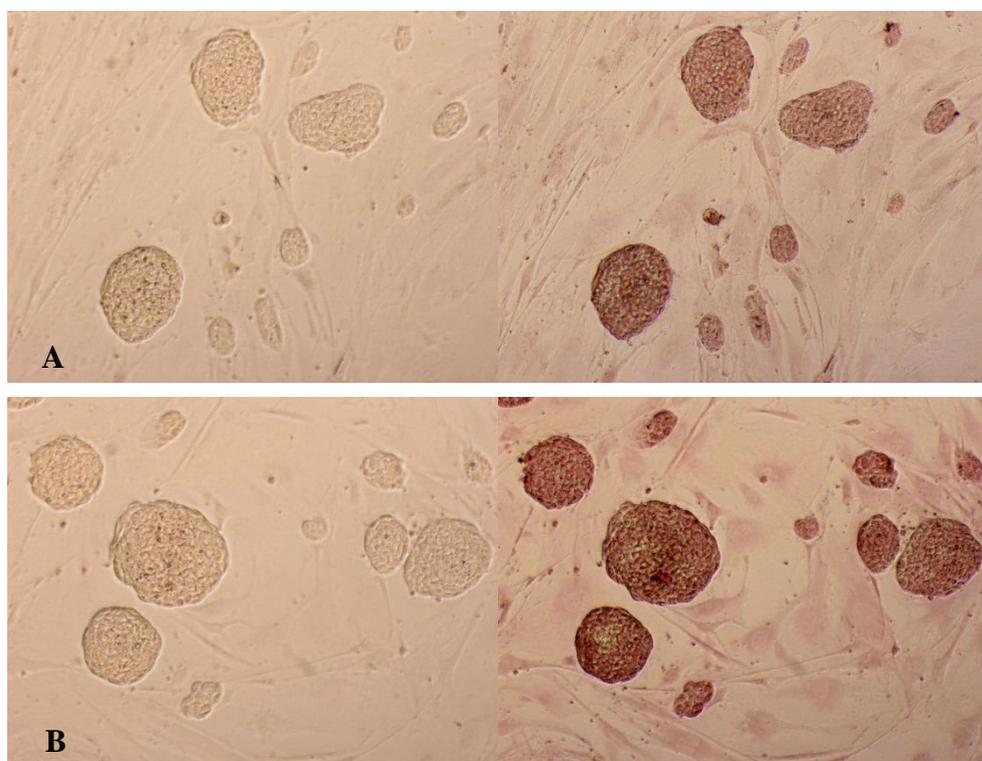


Figura 12. Colorazione con fosfatasi alcalina. Cellule iPSc *Wt* #6.25.39 (A) e #6.25.68 (B) prima (a sinistra) e dopo (a destra) colorazione con fosfatasi alcalina. Il colore rosso indica l'espressione della proteina.

La pluripotenza delle iPSc è stata confermata anche mediante indagini immunocitochimiche per la determinazione dei livelli di espressione di diversi marker di staminalità, come Nanog e SSEA-1, oltre ai geni Sox2 e Oct4 utilizzati per la riprogrammazione.

La linea staminale embrionale E14 e fibroblasti embrionali di topo non trattati sono stati usati, rispettivamente, come controllo positivo e negativo. Ulteriori controlli di specificità sono stati fatti colorando le cellule con i soli anticorpi secondari coniugati, senza l'uso di anticorpi primari.

I cloni iPS *wt* # 6.25.39 (Figura 13) e # 6.25.68 (Figura 14) hanno mostrato livelli di espressione di questi marker simili a quelli della linea di controllo positiva E14.

L'espressione dei geni della pluripotenza è stata inoltre valutata mediante RT-PCR qualitativa (dati non mostrati) e quantitativa.

Il cDNA dei cloni *wt* #6.25.39 e #6.25.68 è stato ottenuto dopo purificazione con biglie magnetiche specifiche per SSEA-1, per isolare le cellule iPS dal substrato di MEF.

I livelli di espressione, così analizzati, dei marker Nanog, c-Myc, Utf1, Gdf3, Zfp42 e Lin28, insieme a quelli dei geni usati per la riprogrammazione, sono risultati essere generalmente simili a quelli delle ES e marcatamente più elevati in confronto a quelli delle cellule MEF (Figura 15).

Un basso livello dell'espressione di Klf4 è stato osservato nei cloni iPS, mentre l'espressione di c-Myc è risultata bassa sia nelle cellule iPS che nelle E14, probabilmente perché i livelli proteici sono stati influenzati dalla fase del ciclo cellulare in cui le cellule si trovavano.

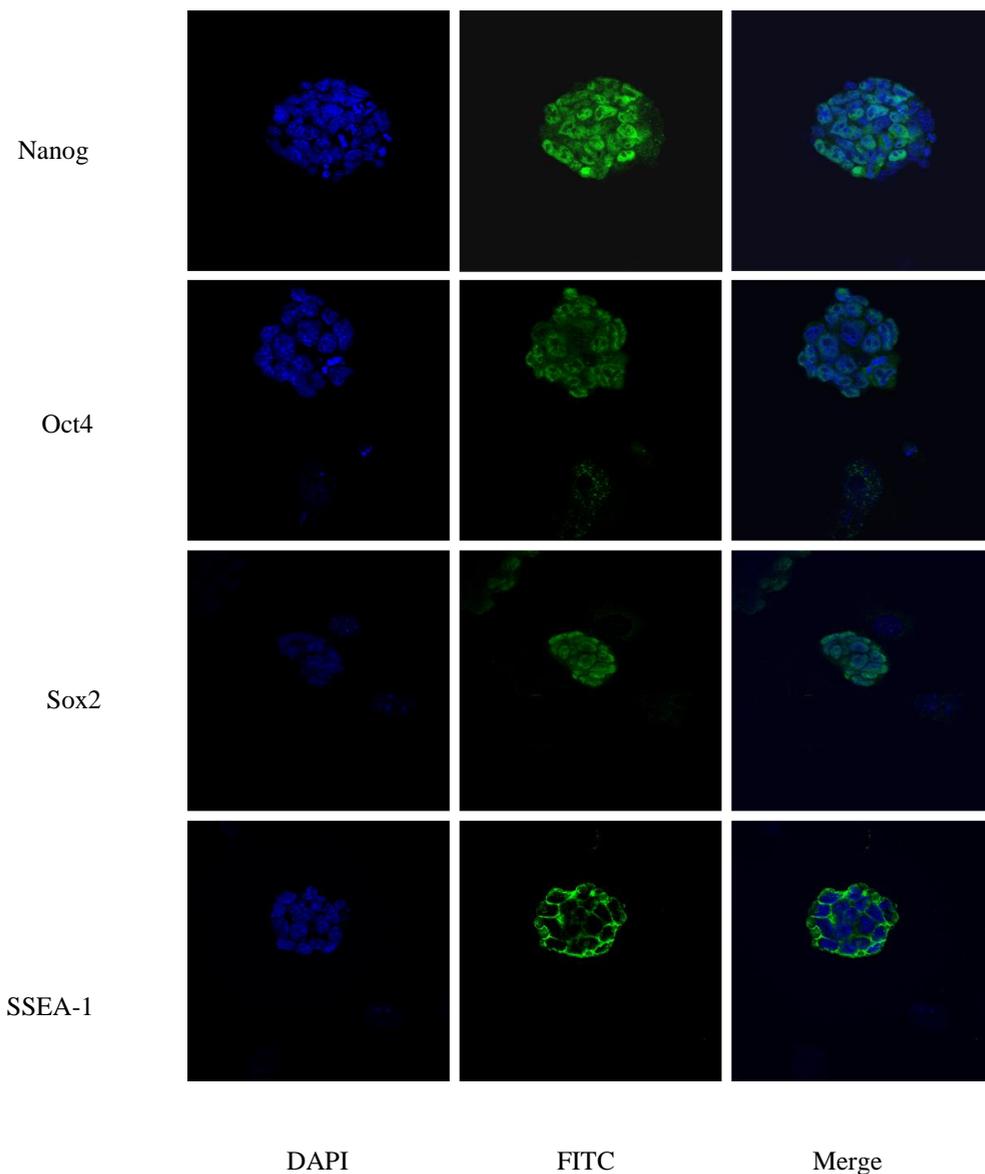


Figura 13. Immagini rappresentative dell'immunoistochimica sul clone iPS wt #6.25.39. Le immagini indicano i livelli di espressione dei marker di staminalità: la prima colonna rappresenta i nuclei colorati con DAPI; la seconda colonna indica l'espressione dei vari marker con fluorescenza verde; la terza colonna rappresenta la sovrapposizione tra DAPI e fluorescenza verde. Ingrandimento 60 X.

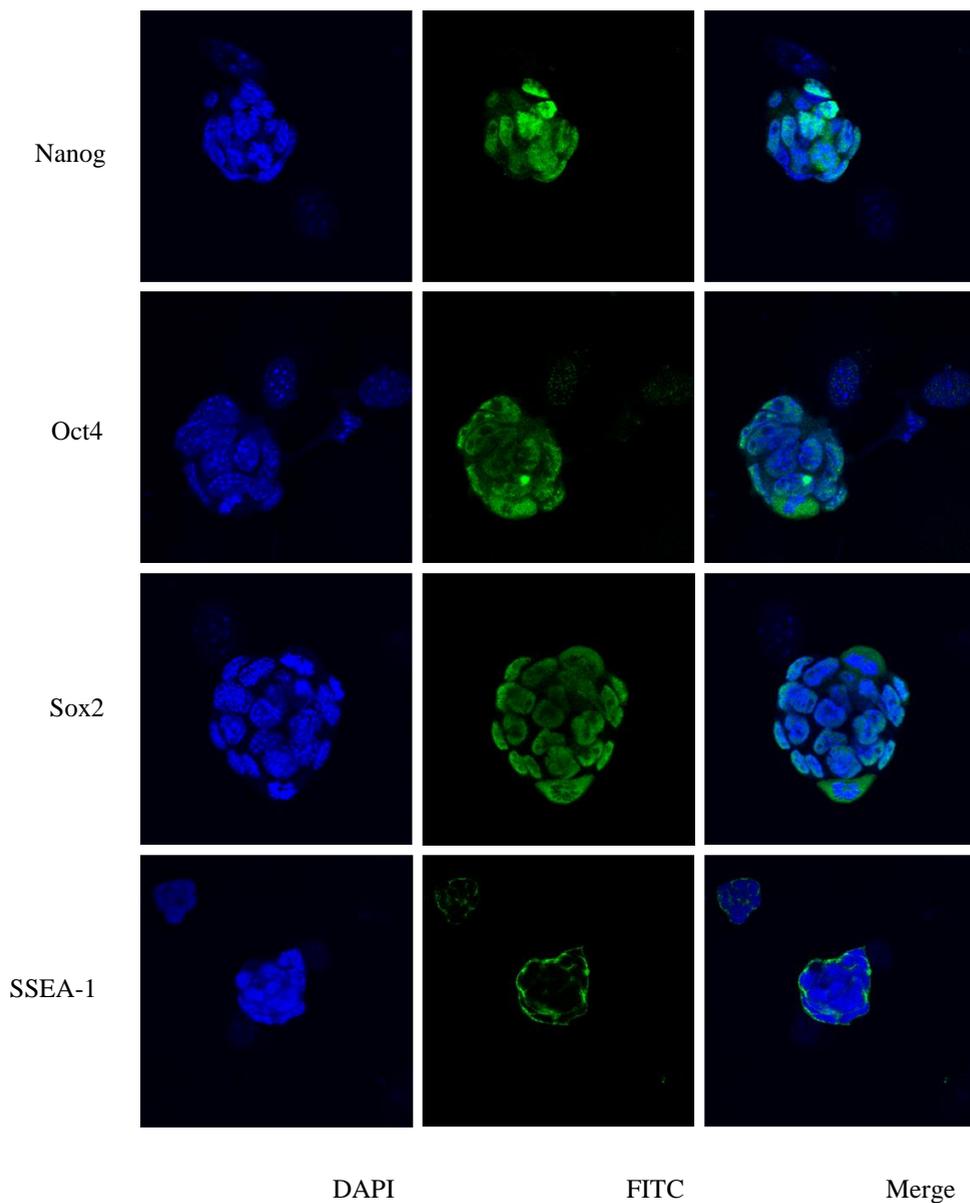


Figura 14. Immagini rappresentative dell'immunoistochimica sul clone iPS wt # 6.25.68.. Le immagini indicano i livelli di espressione dei marker di staminalità: la prima colonna rappresenta i nuclei colorati con DAPI; la seconda colonna indica l'espressione dei vari marker con fluorescenza verde; la terza colonna rappresenta la sovrapposizione tra DAPI e fluorescenza. Ingrandimento 60 X.

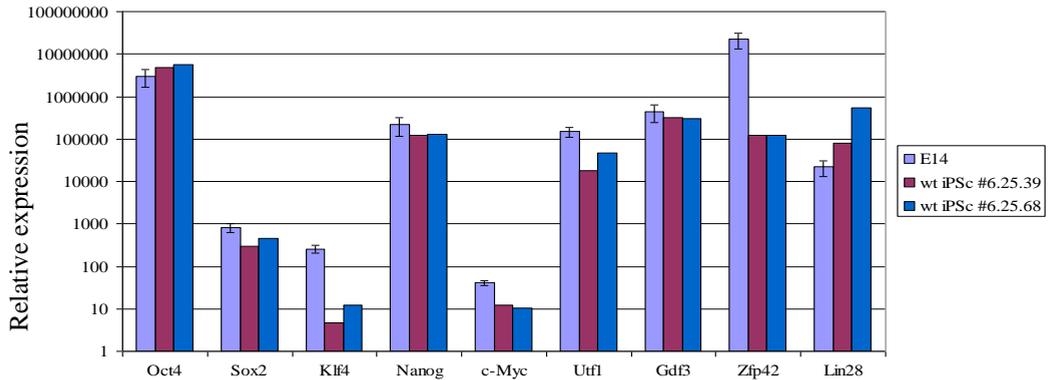


Figura 15. Real-time quantitative RT-PCR per la rilevazione dell'espressione dei marker di staminalità. Gli istogrammi rappresentano le espressioni relative dei vari marker normalizzati sulle MEF. Il cDNA è stato ottenuto da cellule positive per SSEA-1. Le barre indicano le deviazioni standard, n=3.

Il cariotipo analizzato per il clone iPSc wt # 6.25.39 ha mostrato un normale set di cromosomi (Figura 16).

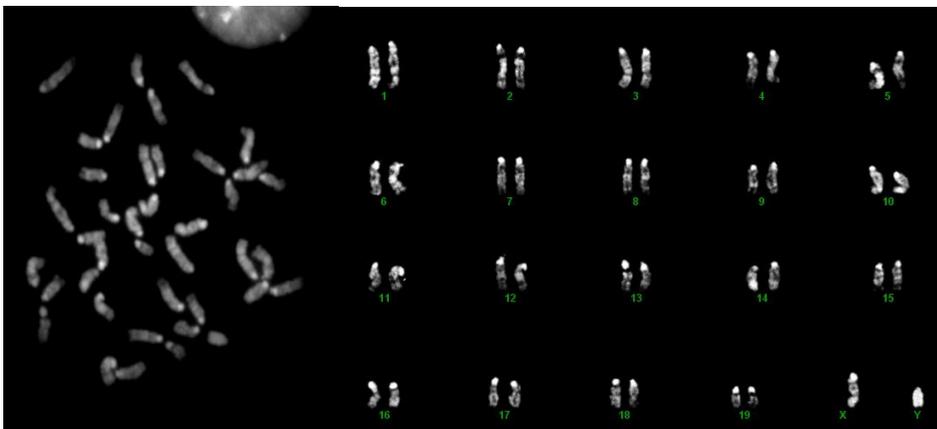


Figura 16. Analisi del cariotipo delle iPSc wt. Esempio di una metafase del clone #6.25.39 (a sinistra) e la sua ricostruzione con presenza di un normale set di cromosomi (a destra).

Poiché la formazione di teratomi in seguito ad iniezione di cellule ES in topi immunodeficienti è considerata una dimostrazione primaria di pluripotenza, abbiamo iniettato in topi immunodeficienti 5 milioni di cellule di ciascuno dei 2 cloni wt # 6.25.39 e # 6.25.68. Entrambe le linee hanno portato alla formazione di noduli in seguito ad iniezione sottocutanea. L'analisi istologica dei tessuti dopo colorazione con ematossilina-eosina ha rilevato la presenza di teratomi con strutture derivanti da tutti e 3 i foglietti germinali embrionali a diversi stadi di differenziazione (Figura 17).

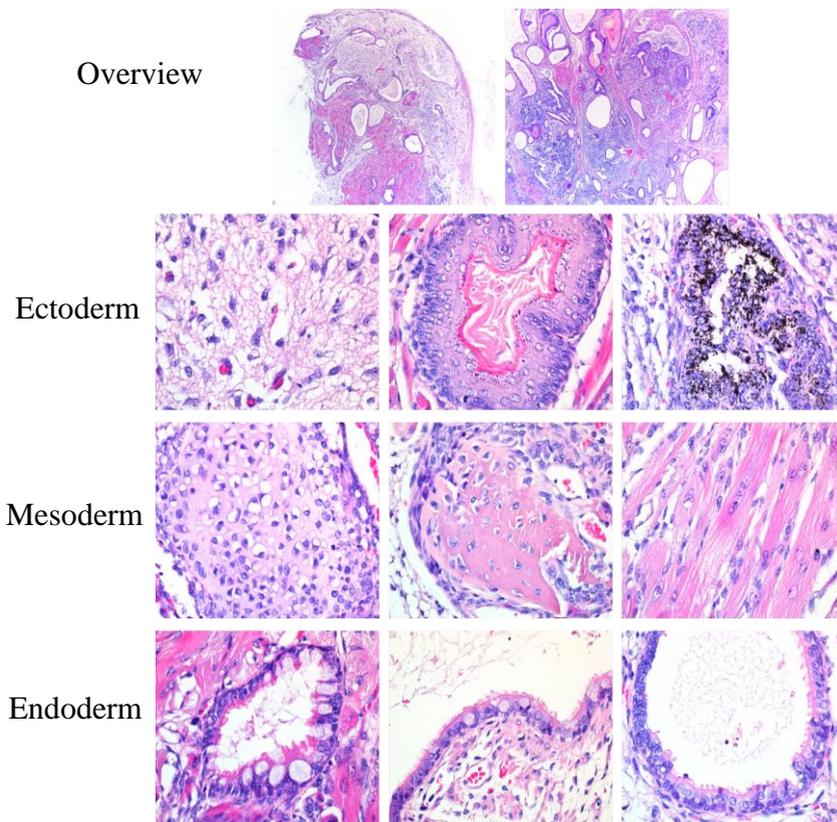


Figura 17. Immagini rappresentative dei teratomi. Esempi di colorazioni con ematossilina e eosina dei teratomi derivati dalle cellule iPS, mostranti una panoramica istologica con ingrandimento 5X in alto e tessuti derivati

dall'ectoderma (tessuto nervoso maturo, epidermide ed epitelio pigmentato), tessuti derivati dal mesoderma (cartilagine, osso e muscolo scheletrico) e tessuti derivati dall'endoderma (epitelio ghiandolare e respiratorio) ad ingrandimento 40X.

A

Criteria	Score
Overall grade of maturation	0=immature (tumor composed only of immature derivatives of embryonic germ layers) 1=immature> mature (tumor mainly composed of immature derivatives of embryonic germ layers) 2=mature>immature (tumor mainly composed of mature well differentiated tissues) 3=mature (tumor composed only of mature well differentiated tissues)
Undifferentiated cells	- = absent
Trophoectodermal derivatives (hemorrhagic areas lined by trophoblastic and syncytiotrophoblastic giant cells)	+/- = unclear + = present
Peripheral infiltration (poorly demarcated margins with focal/multifocal infiltration of surrounding connective tissue)	
Derivatives of three germ cell layers (ectoderm, mesoderm, endoderm)	

B

	#6.25.39		#6.25.68			E14 *	
Overall grade of maturation	2.5	2.5	1.5	1	2.5	1.5	2
Undifferentiated cells	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
Trophoectodermal derivatives	-	-	+	-	-	-	-
Peripheral infiltration	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Ectodermal derivatives							
Primitive neuroepithelium	+/-	+	+	+	+	+	-
Mature nervous tissue	+	+	+	+	+	+	+
Keratinized epithelium	+	+	-	-	+	-	+
Hairs and follicles	-	+/-	-	-	-	-	-
Mesodermal derivatives							
Connective tissue	+	+	+	+	+	+	+
Cartilage	+	+	-	-	+	+	-
Bone	-	+/-	-	-	+	-	-
Muscle (smooth and/or skeletal)	+	+	-	+	+	-	+
Adipose tissue	-	+	-	+	+	-	-
Endodermal derivatives							
Ciliated epithelium w/ or w/o goblet cells	+	+	+	+	+	+	+
Gut epithelium w/ or w/o goblet cells	+	+	+	+	+	+	+
Gland structures	+	+	+	+	+	+	+

*presence of multifocal hemorrhages
ne=not evaluable

Tabella 19. Valutazione istologica dei teratomi. (A) Spiegazione dei criteri con cui sono stati assegnati i punteggi. (B) I punteggi assegnati ai campioni sono indicate nella parte alta della tabella.

I campioni sono stati analizzati in cieco, senza conoscere i dettagli del disegno sperimentale, e confrontati con la linea cellulare E14 come controllo positivo. La valutazione istologica è stata fatta prendendo in considerazione le caratteristiche riportate in Tabella 19. Abbiamo riportato i punteggi di due diversi teratomi per il clone iPS wt # 6.25.39 e tre per il clone # 6.25.68. Come indicato, i teratomi derivati dalle E14 hanno mostrato punteggi simili a quelli dei cloni.

3.1.2. Generazione di cellule iPS da topi oc/oc

3.1.2.1. Derivazione di iPSc da topi oc/oc mediante vettore lentivirale policistronico di terza generazione

Per generare linee iPS del modello murino della forma osteopetrotica da noi studiata, abbiamo utilizzato fibroblasti ottenuti da biopsie caudali di un topo femmina del ceppo mutato *oc/oc* C57BL/6 CD45.1.

Il vettore lentivirale che abbiamo usato per la riprogrammazione è lo stesso descritto in precedenza per i fibroblasti *wt*.

La trasduzione di 2×10^5 cellule ad una MOI di 1, ha portato alla crescita di colonie iPS che sono state raccolte sulla base della loro morfologia simil-ES.

Siamo stati in grado di isolare diciannove diverse linee iPS, corrispondenti ad una efficienza di riprogrammazione dello 0.0095%.

Di ciascun clone è stato analizzato il VCN mediante real-time quantitative PCR e ne è stata valutata anche la distribuzione numerica (Tabella 20).

iPS clones	VCN	% normal distribution of chromosomes
<i>oc/ociPSc #1</i>	56.6	50%
<i>oc/ociPSc #2</i>	53.4	52%
<i>oc/ociPSc #3</i>	25.9	n.d.
<i>oc/ociPSc #4</i>	13.7	41%
<i>oc/ociPSc #5</i>	18.7	31%
<i>oc/ociPSc #6</i>	20.0	56%
<i>oc/ociPSc #7</i>	26.9	40%
<i>oc/ociPSc #8</i>	33.4	65%
<i>oc/ociPSc #9</i>	26.8	n.d.
<i>oc/ociPSc #10</i>	79.5	63%
<i>oc/ociPSc #11</i>	46.3	55%
<i>oc/ociPSc #12</i>	n.a.	37%
<i>oc/ociPSc #13</i>	10.6	70%
<i>oc/ociPSc #14</i>	44.0	35%
<i>oc/ociPSc #15</i>	48.6	77%
<i>oc/ociPSc #16</i>	20.9	80%
<i>oc/ociPSc #17</i>	14.4	69%
<i>oc/ociPSc #18</i>	16.3	n.d.
<i>oc/ociPSc #19</i>	12.0	18%

Tabella 20. VCN e analisi della distribuzione cromosomica dei cloni iPS *oc/oc*. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR. In grassetto i cloni ulteriormente caratterizzati. n.d. = non disponibile.

Nonostante l'elevato VCN, è stata rilevata una normale distribuzione di cromosomi senza riarrangiamenti visibili in un numero di metafasi più alto di quello osservato nei precedenti esperimenti. I cloni iPS *oc/oc* #13 e #16, con un normale assetto cromosomico, sono stati scelti per le successive analisi (Figura 18).

oc/oc iPSc #16

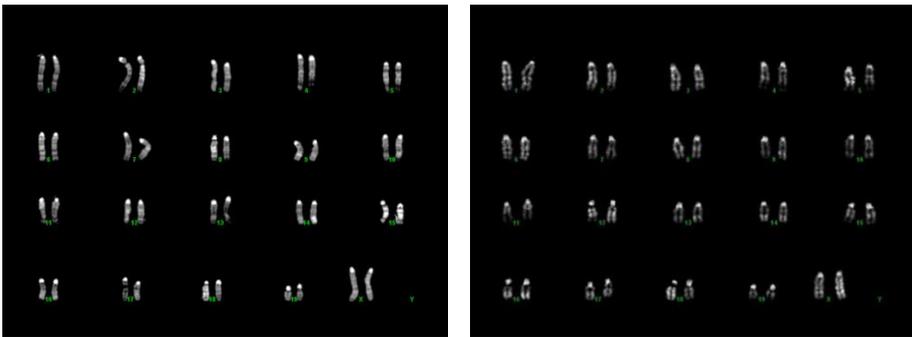
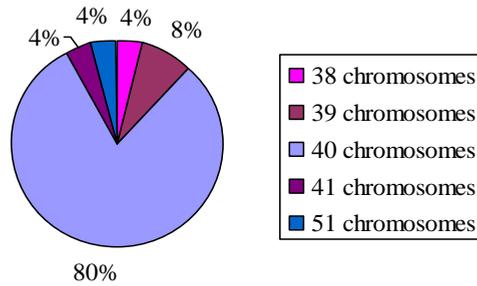


Figura 18. Distribuzione numerica dei cromosomi e analisi del cariotipo dei cloni iPS *oc/oc*. In alto, distribuzione percentuale del numero di cromosomi nelle metafasi del clone #16. In basso, ricostruzione del cariotipo del clone #13 (a sinistra) e del clone #16 (a destra), con un normale set di cromosomi.

Come dimostrazione della pluripotenza delle linee riprogrammate, abbiamo iniettato 5 milioni di cellule di ciascuno dei 2 cloni iPS *oc/oc* #13 e #16, in topi immunodeficienti CD1. Entrambe le linee hanno portato alla formazione di noduli in seguito ad iniezione sottocutanea. L'analisi istologica dei tessuti dopo colorazione con ematossilina-eosina ha rilevato la presenza di teratomi con strutture derivanti da tutti e 3 i foglietti germinali embrionali a diversi stadi di differenziazione (Figura 19).

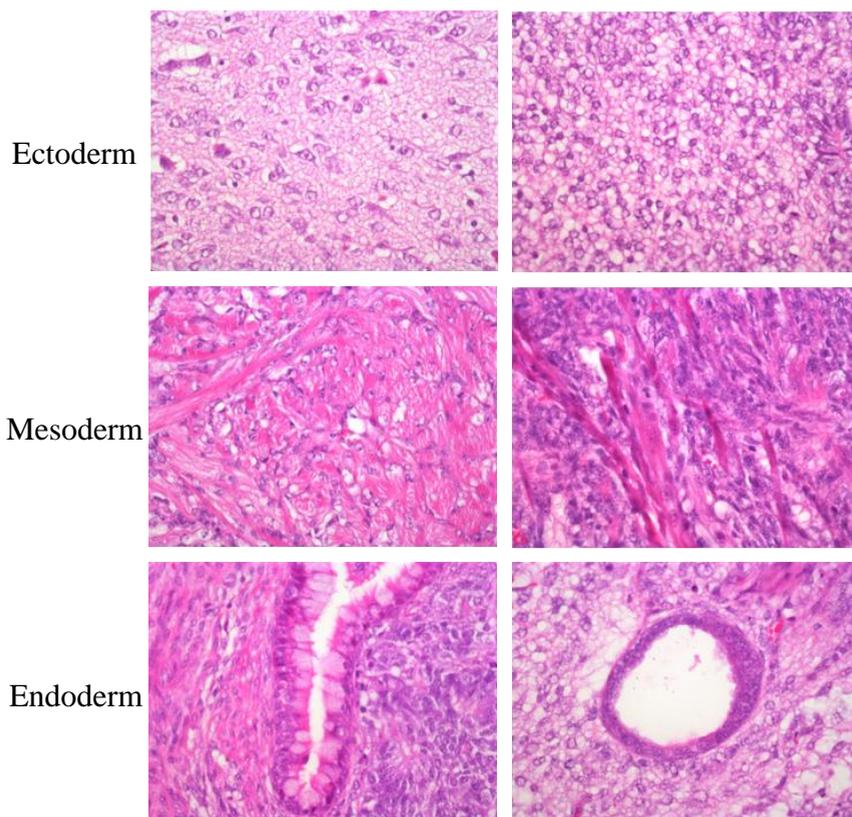


Figura 19. Immagini dei teratomi. Colorazione con ematossilina e eosina dei teratomi derivati dalle cellule iPS *oc/oc* #13 (pannelli a sinistra) e #16 (pannelli a destra), mostrandoti tessuti istologici derivati dall'ectoderma (neuroepitelio maturo), tessuti derivati dal mesoderma (muscolo scheletrico) e tessuti derivati dall'endoderma (epitelio ciliato e ghiandole mucose) ad ingrandimento 40X.

Come in precedenza, i campioni istologici sono stati analizzati in cieco e confrontati con la linea cellulare staminale embrionale HM1, usata come controllo positivo. La valutazione è stata fatta prendendo in considerazione le caratteristiche descritte in Tabella 19. Abbiamo riportato i punteggi di un teratoma per ciascuno dei due clone iPS *oc/oc* #13 e #16 e due per il

controllo HM1 (Tabella 21). Come indicato in tabella, i teratomi derivati dai cloni hanno mostrato punteggi simili a quelli generati dalle cellule HM1.

	<i>Clone #16</i>	<i>HM1</i>	<i>HM1</i>	<i>Clone #13</i>
	↑	↑	↑	↑
Mouse No.	6207	6201 dx	6201 sx	6210
	6	7	8	9
Overall grade of maturation	1,5	2	2	2
Undifferentiated cells	+	+	+/-	+
Peripheral infiltration	ne	ne	ne	ne
Trophoectodermal derivatives	-	-	-	-
Ectodermal derivatives				
Primitive neuroepithelium	+	+	+	+/-
Mature nervous tissue	+	+	+	+
Keratinized epithelium	-	+/-	-	+
Hairs and follicles	-	-	-	-
Mesodermal derivatives				
Connective tissue	+	+	+	+
Cartilage	+/-	+	-	+
Bone	-	-	-	-
Muscle (smooth and/or skeletal)	+	+	-	+
Adipose tissue	-	-	-	-
Endodermal derivatives				
Ciliated epithelium w/ or w/o goblet cells	+/-	+	+	+
Gland structures	+/-	-	+	+/-
	Nervous tissue > 90%	Nervous tissue > 90%	Nervous tissue > 90%	Nervous tissue approx 70%

Tabella 21. Valutazione istologica dei teratomi. I punteggi assegnati ai campioni sono indicati nella parte alta della tabella.

3.1.2.2. Eliminazione del vettore lentivirale policistronico

Le cellule riprogrammate sono state trattate con la Cre ricombinasi mediante lipofezione del plasmide contenente il suo cDNA, con le modalità descritte in precedenza. Dopo una settimana il VCN è stato valutato sulle cellule totali in coltura (Tabella 22).

Cloni iPS	VCN
<i>oc/ociPSc #13</i>	12.4
<i>oc/ociPSc #16</i>	15.5

Table 22. Valori di VCN valutati dopo il trattamento con Cre ricombinasi. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR.

Poiché il VCN mostrava valori elevati, le iPSc sono state trasfettate di nuovo, per due volte consecutive, con il plasmide contenente la Cre e in seguito sottoclonate alla diluzione limite di 0.3 cellule/pozzetto.

Abbiamo così ottenuto 68 sottoclone dalle iPSc *oc/oc* #13 e 14 sottoclone dalle iPSc #16. Molti dei cloni ottenuti sono stati analizzati per VCN e distribuzione cromosomica (Tabella 23).

I sottoclone iPSc *oc/oc* #13.62 dal clone 13 e #16.6 e #16.9 dal clone 16, quasi completamente privi di copie di vettore integrate e con una percentuale di metafasi con un normale numero di cromosomi pari all' 89%, 76% e 79.4% rispettivamente, sono stati scelti come cloni migliori per le successive analisi (Figura 20).

oc/oc iPS #13	VCN	normale distribuzione dei cromosomi
1	0,008	n.d.
3	0,009	n.d.
4	0,014	n.d.
11	0,019	n.d.
12	0,02	n.d.
15	0,017	n.d.
18	0,005	n.d.
22	0	n.d.
26	0,011	n.d.
28	0,006	n.d.
30	0	n.d.
32	0,012	n.d.
42	0,018	n.d.
48	0,007	n.d.
49	0,004	n.d.
52	0,005	n.d.
61	0,008	n.d.
62	0,008	89%
64	0,003	n.d.
65	0,007	79%
69	0,008	n.d.

oc/oc iPS #16	VCN	normale distribuzione dei cromosomi
1	18.9	n.d.
2	17.9	n.d.
3	0.00059	0%
4	14.3	n.d.
5	0.0015	6%
6	0.00016	76%
7	18.6	n.d.
8	21.7	n.d.
9	0	79.4%
10	17.7	n.d.
11	0.00072	19%
14	20.2	n.d.

Tabella 23. VCN e analisi della distribuzione numerica dei cromosomi nelle iPS oc/oc dopo il trattamento con la Cre. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR, per il clone #13 (a sinistra) e per il #16 (a destra). In grassetto i cloni ulteriormente caratterizzati. n.d. = non disponibile.

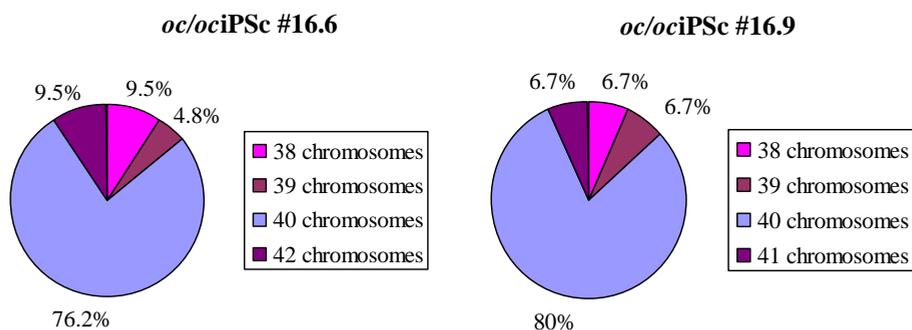


Figura 20. Distribuzione numerica dei cromosomi dei cloni iPSc *oc/oc*. Distribuzioni percentuali del numero di cromosomi nelle metafasi dei cloni selezionati.

Per ampliare il numero di linee iPSc *oc/oc* a nostra disposizione, di cui poter correggere il difetto genetico, abbiamo effettuato un secondo sottoclonaggio della linea madre *oc/oc* iPSc #16, che era già stata trattata per 3 volte con la Cre ricombinasi per abbassare i valori di VCN, risultanti elevati dopo la prima trasfezione (v. Tabelle 22 e 23).

Questo secondo sottoclonaggio è stato effettuato anche in considerazione dei valori di VCN ottenuti per il clone #13, mediamente molto più bassi rispetto a quelli del clone #16, e che ci hanno spinto a cercare di ottenere una più efficace eliminazione delle copie del vettore anche per questa linea.

Pertanto, le cellule del clone #16 sono state nuovamente sottoclonate alla diluizione limite di 0.3 cellule/pozzetto e hanno portato all'isolamento di 77 sottocloni, il cui VCN è stato analizzato. Come si può vedere dai risultati raccolti nella Tabella 24, una buona parte di essi presentava valori pari o prossimi allo zero.

oc/oc iPS #16	VCN	oc/oc iPS #16	VCN	oc/oc iPS #16	VCN
1	13,763	30	0,012	59	0,008
3	0,877	31	8,711	60	3,37
4	0	32	13,016	63	3,957
5	3,048	33	0,001	64	13,26
6	6,737	34	0,007	66	0,897
7	14,414	35	0,004	67	0
8	14,729	36	0	68	17,687
9	9,187	37	0	69	8,235
10	7,934	38	0,002	70	1,991
11	0	39	0,462	71	2,234
12	0	40	6,642	72	0,014
14	0	41	10,121	73	0
15	5,139	42	0	74	0
16	0,968	43	0	75	11,044
17	9,968	44	2,474	77	8,278
18	0,051	45	4,74	78	11,129
19	0,06	46	6,993	80	13,062
20	0,001	47	5,374	83	0,007
21	0	48	1,323	84	0,007
22	11,178	50	0,007	85	0
23	2,777	51	9,878	87	9,432
24	9,89	53	1,358	88	0
25	0	55	0	90	6,865
26	0,01	56	0,895	91	2,708
27	7,527	57	12,622		
28	11,031	58	0		
29	0,002				

Tabella 24. VCN dei cloni iPS oc/oc #16 dopo il secondo sottoclonaggio. Il VCN è stato valutato mediante real-time quantitative PCR. In grassetto i cloni con VCN pari o prossimo a zero. In rosso il clone ulteriormente caratterizzato.

Di tutti i sottocloni con VCN pari o prossimo a zero è stata valutata la distribuzione cromosomica e tra essi è stato scelto il clone #16.74, con una

percentuale di metafasi con normale numero di cromosomi pari all' 89%.
Delle metafasi che presentavano una normale distribuzione numerica dei cromosomi è stato ricostruito il cariotipo: un esempio è mostrato in figura 21.

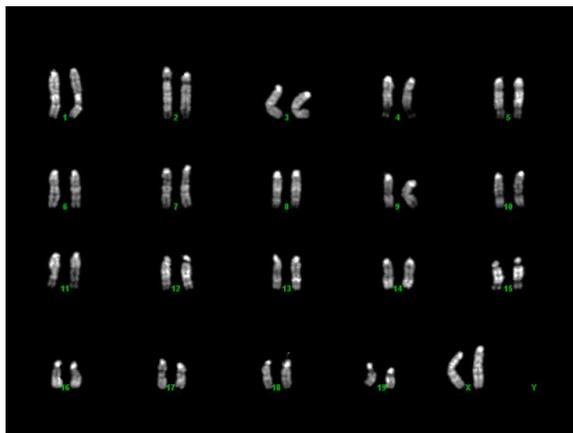


Figura 21. Analisi del cariotipo del clone iPSc *oc/oc* #16.74. Ricostruzione del cariotipo del clone, mostrandone un normale set di cromosomi.

3.1.2.3. Caratterizzazione delle linee iPSc *oc/oc*

La staminalità dei cloni iPSc *oc/oc* selezionati (#16.6, #16.9, #16.74 e #13.62) è stata valutata, come in precedenza, mediante l'espressione della fosfatasi alcalina. Essi sono risultati esprimere alti livelli di questo marker in confronto al substrato nutritivo di MEF (es. in figura 22).

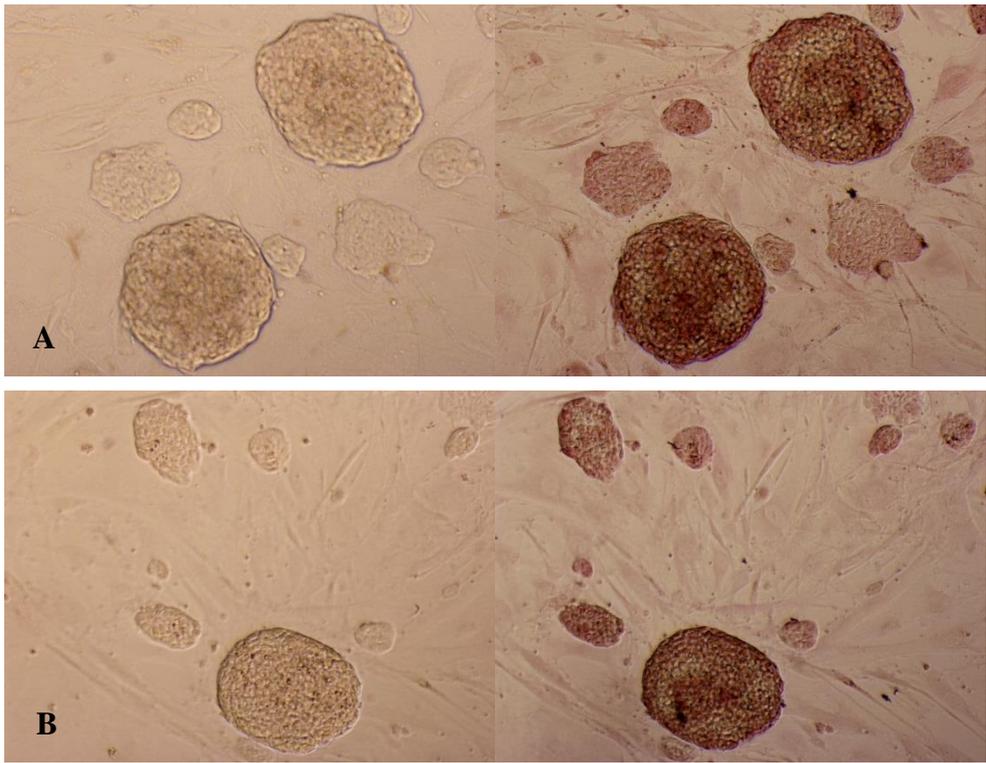


Figura 22. Immagini rappresentative della colorazione con Fosfatasi Alcalina. iPS *oc/oc* #16.6 (A) e #16.9 (B) prima (a sinistra) e dopo (a destra) colorazione con fosfatasi alcalina. Il colore rosso indica l'espressione della proteina.

La pluripotenza dei cloni iPS *oc/oc* è stata confermata mediante analisi immunocitochimiche per determinare i livelli di espressione dei diversi marker di staminalità, presenti o meno nel vettore riprogrammante, come descritto in precedenza. I cloni hanno mostrato elevati livelli di espressione di questi marker (Figure 23 e 24), simili a quelli della linea di controllo positivo E14. Come in precedenza, i fibroblasti embrionali di topo non trattati sono stati usati come controllo negativo.

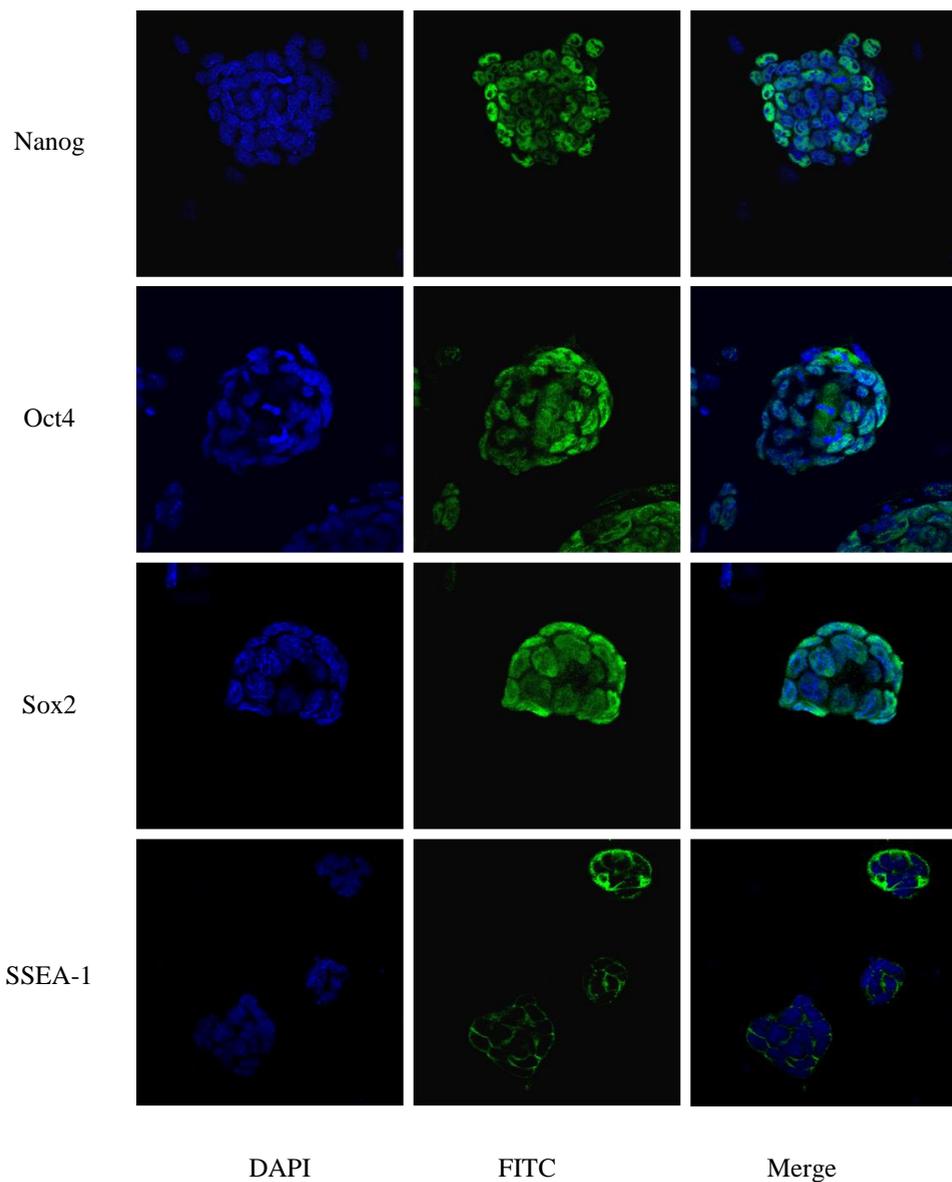


Figura 23. Immagini rappresentative dell'immunoistochimica sulle cellule iPS. Livelli di espressione dei marker di staminalità della linea iPS oc/oc #16.9: la prima colonna rappresenta i nuclei colorati con DAPI; la seconda colonna indica l'espressione dei vari marker con fluorescenza verde; la terza colonna rappresenta la sovrapposizione tra DAPI e fluorescenza verde. Ingrandimento 60 X.

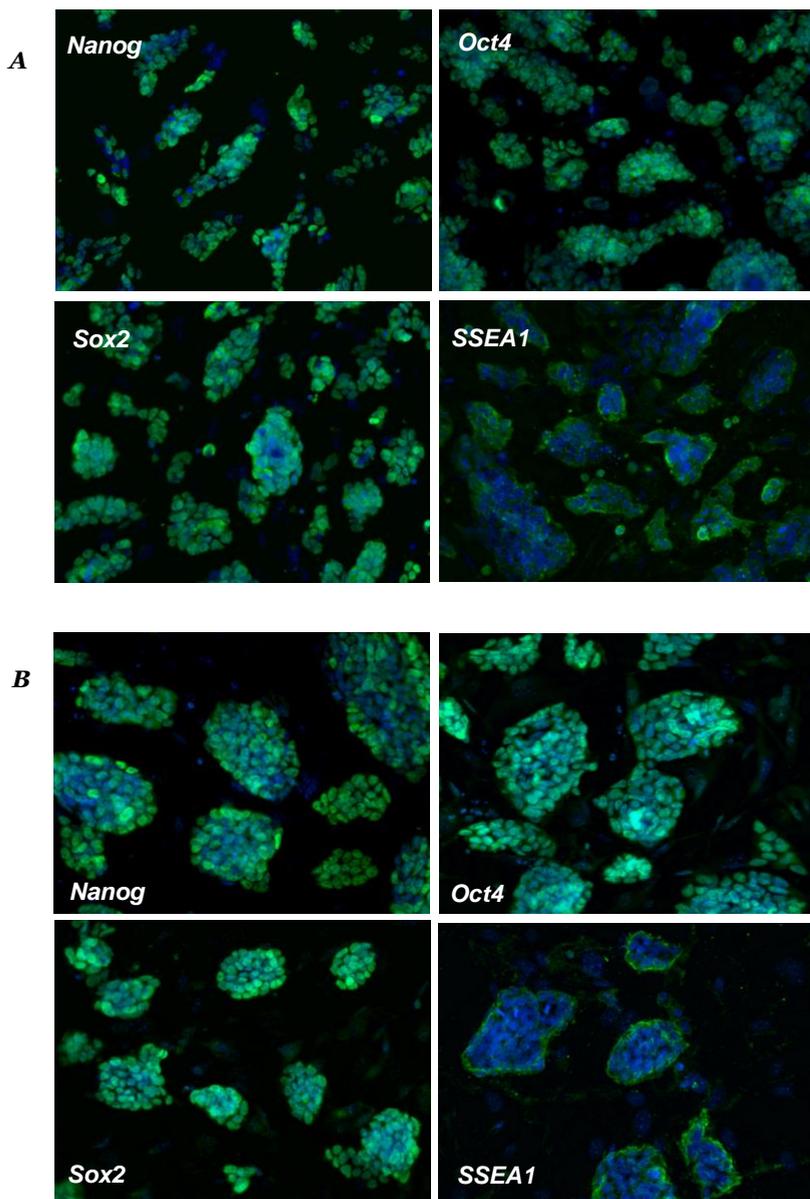


Figura 24. Analisi immunoistochimica sulle cellule iPS oc/oc. Livelli di espressione dei marker di staminalità della linea iPS oc/oc #13.62 (A) e #16.74 (B): in ogni pannello è indicata l'espressione dei vari marker data dalla sovrapposizione tra colorazione con DAPI e fluorescenza verde. Ingrandimento 40 X.

L'espressione dei geni della pluripotenza è stato inoltre valutata mediante real-time PCR qualitativa (dati non mostrati) e quantitativa. Il cDNA dei cloni iPS *oc/oc* è stato ottenuto dopo purificazione con biglie magnetiche specifiche per SSEA-1 e dopo aver sottoposto le cellule a tre passaggi in piastre trattate con gelatina, al fine di purificare completamente le cellule iPS dal substrato di MEF. Le linee cellulari staminali E14 e HM1 e le iPS *wt* #6.25.39 sono state utilizzate come controlli positivi.

I livelli di espressione, così analizzati, dei principali marker di pluripotenza Nanog, Oct4, Sox2 e Klf4 sono risultati essere generalmente simili a quelli delle ESC (Figure 25 e 26) e marcatamente (significativamente) più elevati in confronto a quelli delle cellule MEF utilizzate come controllo negativo.

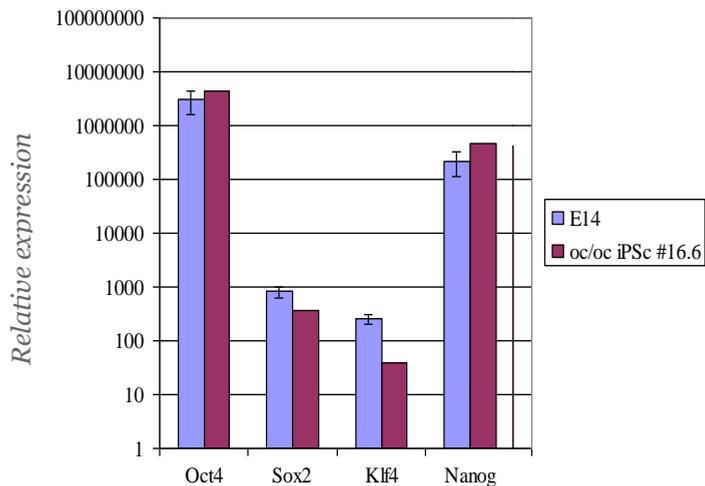


Figura 25. Real-time quantitative RT-PCR per la valutazione dell'espressione dei marker di staminalità nel clone iPS #16.6. Gli istogrammi rappresentano le espressioni relative dei vari marker normalizzati sulle MEF e confrontate con la linea di controllo E14. Le barre indicano la deviazione standard.

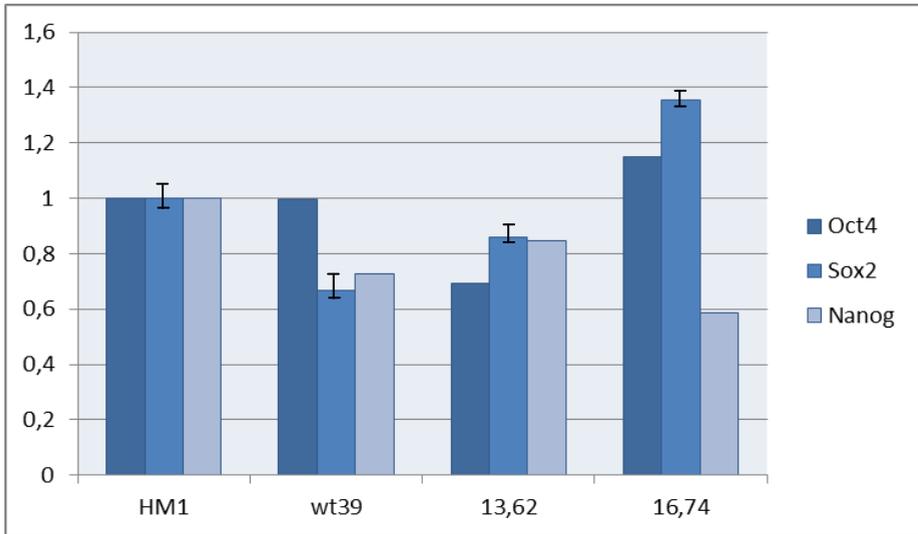


Figura 26. Real-time quantitative RT-PCR per la valutazione dell'espressione dei marker di pluripotenza nei cloni iPS #13.62 e #16.74. Gli istogrammi rappresentano le espressioni relative dei vari marker normalizzati sulle HM1 e confrontate con il clone iPS *wt* 6.25.39. Le barre indicano la deviazione standard.

L'analisi del cariotipo delle linee iPS selezionate ha mostrato un normale set di cromosomi per i cloni iPS *oc/oc* #16.9, #13.62 e #16.74, mentre ha rilevato la presenza di un riarrangiamento nel clone #16.6, che per questo motivo è stato scartato (Figura 27). Il clone 16.6 è stato, infatti, analizzato più in dettaglio in quanto l'analisi iniziale aveva rivelato un anomalo set di cromosomi XY, benchè il clone derivasse da fibroblasti di un topo femmina. Mediante analisi FISH, è stato infatti possibile stabilire che il cromosoma indicato come Y era in realtà un cromosoma X deletato (Figura 28).

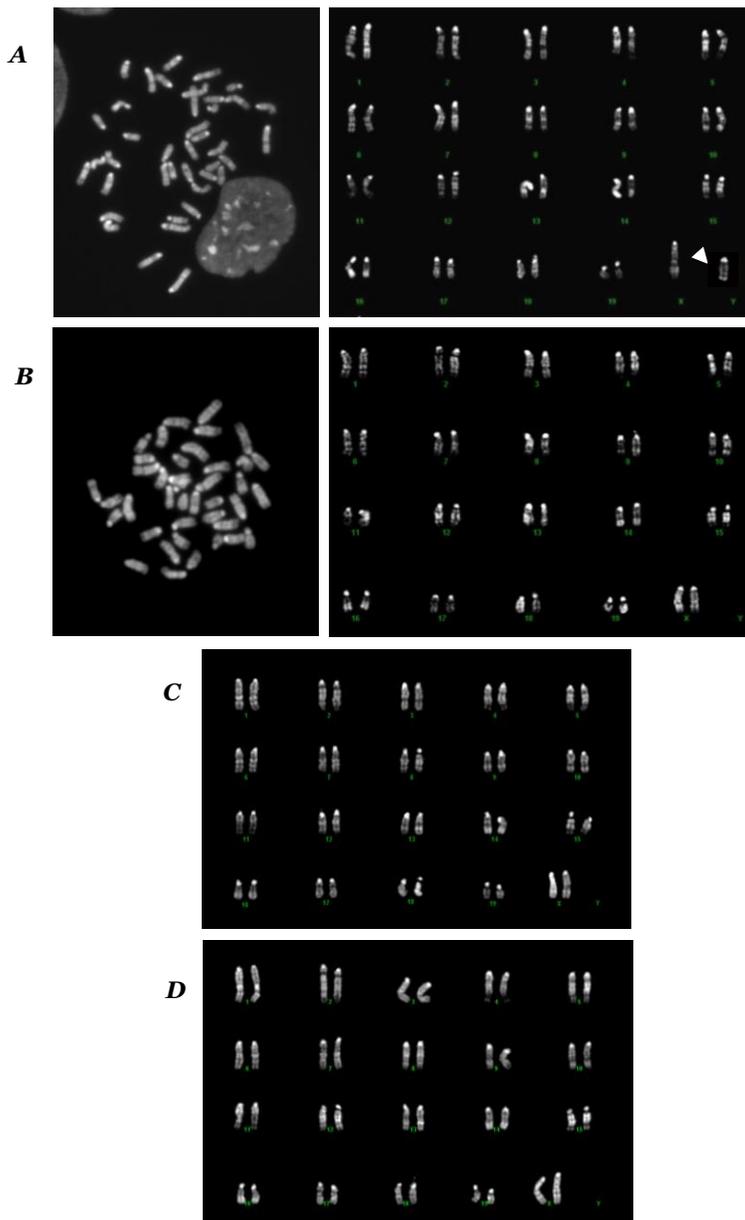


Figura 27. Analisi del cariotipo dei cloni iPSc *oc/oc* #16.6, #16.9, #13.62 e #16.74 (A) Cariotipo del clone #16.6 con una metafase (a sinistra) e la sua ricostruzione (a destra). La freccia indica l'anomala presenza del di un cromosoma Y. (B) Cariotipo del clone #16.9 con una metafase (a sinistra) e la sua ricostruzione (a destra). (C e D) Ricostruzione del cariotipo dei cloni #13.62 e #16.74.

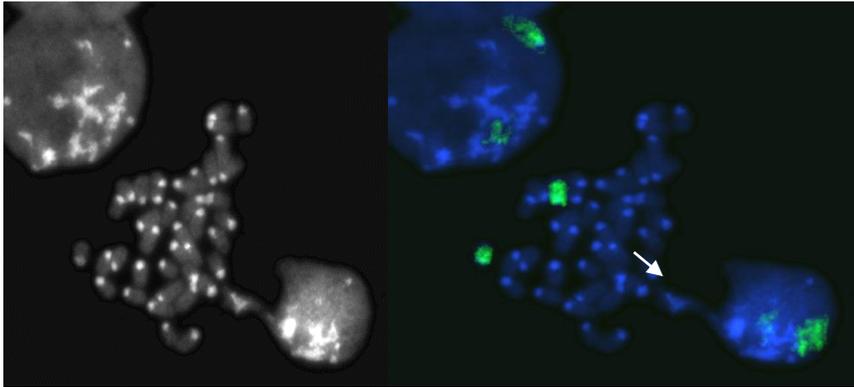


Figura 28. Analisi FISH. (A) Immagine di una metafase del clone iPSc *oc/oc* #16.6. (B) La stessa metafase analizzata con saggio FISH. Il DNA è colorato con DAPI, in blu, mentre la sonda specifica per il cromosoma X è colorata in verde. La freccia indica il cromosoma X deletato.

Come ulteriore prova dell'acquisizione della pluripotenza da parte delle linee riprogrammate selezionate (#16.9, #13.62 e #16.74), ne abbiamo testato la capacità di differenziarsi *in vivo*, iniettando 5 milioni di cellule di ciascuno dei cloni iPSc *oc/oc* in topi immunodeficienti CD1.

Le varie linee hanno portato alla formazione di noduli in seguito ad iniezione sottocutanea. L'analisi istologica dei tessuti dopo colorazione con ematossilina-eosina ha rilevato la presenza di teratomi con strutture derivanti da tutti e 3 i foglietti germinali embrionali a diversi stadi di differenziazione. Come in precedenza, i campioni istologici sono stati analizzati in cieco e confrontati con la linea cellulare riprogrammata iPSc *wt* #6.25.39, usata come controllo positivo.

La valutazione è stata fatta prendendo in considerazione le caratteristiche descritte in Tabella 19. Abbiamo riportato i punteggi di due teratomi per la linea iPSc *wt* #6.25.39, 1 per la linea iPSc *oc/oc* #16.74 e due per la linea #13.62. I teratomi derivati dai cloni hanno mostrato punteggi simili a quelli generati dalle cellule HM1.

Poiché una caratteristica peculiare delle ESC, nonché una dimostrazione di pluripotenza delle cellule riprogrammate iPS, è data dalla capacità di formare *in vitro* corpi embrioidi (EBs) in grado di differenziare nei tre foglietti germinali embrionali, prima di correggere il difetto genetico delle linee fin qui caratterizzate, abbiamo effettuato un ulteriore controllo valutando l'espressione di marcatori specifici di tutti e tre i tessuti primari negli EBs derivati dalle linee stesse.

Gli EBs sono stati ottenuti da ciascuna delle tre linee iPS oc/oc #16.9, #16.74 e #13.62, tramite il metodo delle "hanging drops", seminando circa 500 cellule per goccia con terreno per ESC in assenza di LIF e tenendole in coltura capovolte. Dopo due giorni gli EBs sono stati raccolti e piastrati in numero variabile, da 5 a 10, su vetrini trattati con gelatina per essere analizzati mediante immunisto chimica e, parallelamente, in piastre multi-well per estrarne l'RNA per le analisi di Reverse Transcription-PCR (RT-PCR). Inoltre, circa 5 EBs di ciascuna linea sono stati seminati in piastre multi-well non trattate per l'adesione, per testare la formazione dei cardiomiociti, riconoscibili in coltura grazie alla loro capacità di contrazione ritmica.

Dopo 5 giorni di coltura, alcune delle cellule differenziate su vetrino sono state analizzate tramite immunisto chimica per i marker AFP e Brachyury, specifici per endoderma e mesoderma rispettivamente, mentre ad altri pozzetti è stato aggiunto acido retinoico per ottenere l'espressione della Nestina, marcatore specifico dell'ectoderma, che si esprime dopo 9-19 giorni di coltura.

L'RNA, invece, è stato estratto dalle cellule in giorni variabili della coltura per essere analizzato per vari marker di differenziazione, come AFP e HNF per l'endoderma, Sox1 e Nestina per l'ectoderma, Flt1 e BMP2 per il mesoderma.

Tutte e tre le linee sono risultate positive per gli specifici marcatori analizzati, sia mediante RT-PCR (Figura 29) sia tramite immunohistochimica (Figura 30), mentre cardiomiciti pulsanti sono stati individuati dopo 7 giorni di coltura.

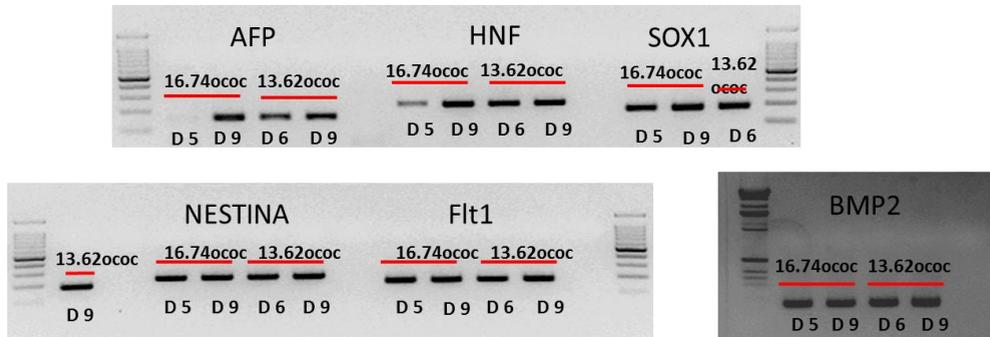


Figura 29. Analisi dell'espressione di vari marker di differenziazione nei cloni iPSc oc/oc #16.74 e #13.62. Con D5, D6 e D9 sono indicati i giorni di differenziazione in corrispondenza dei quali è stata analizzata l'espressione dei marker.

A

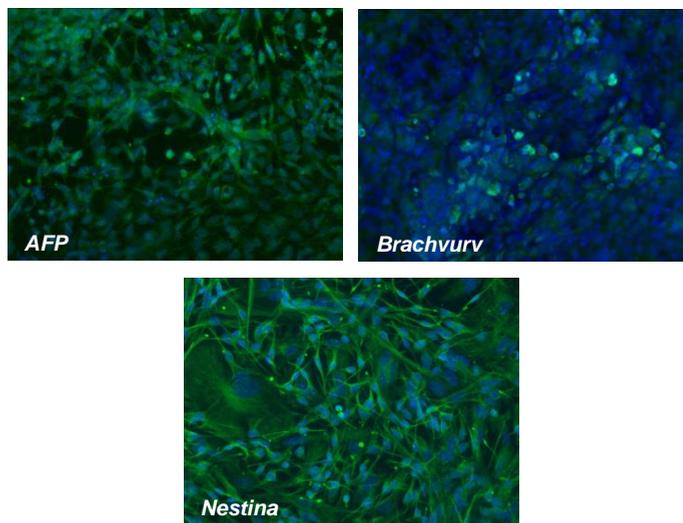


Figura 30.
(Segue)

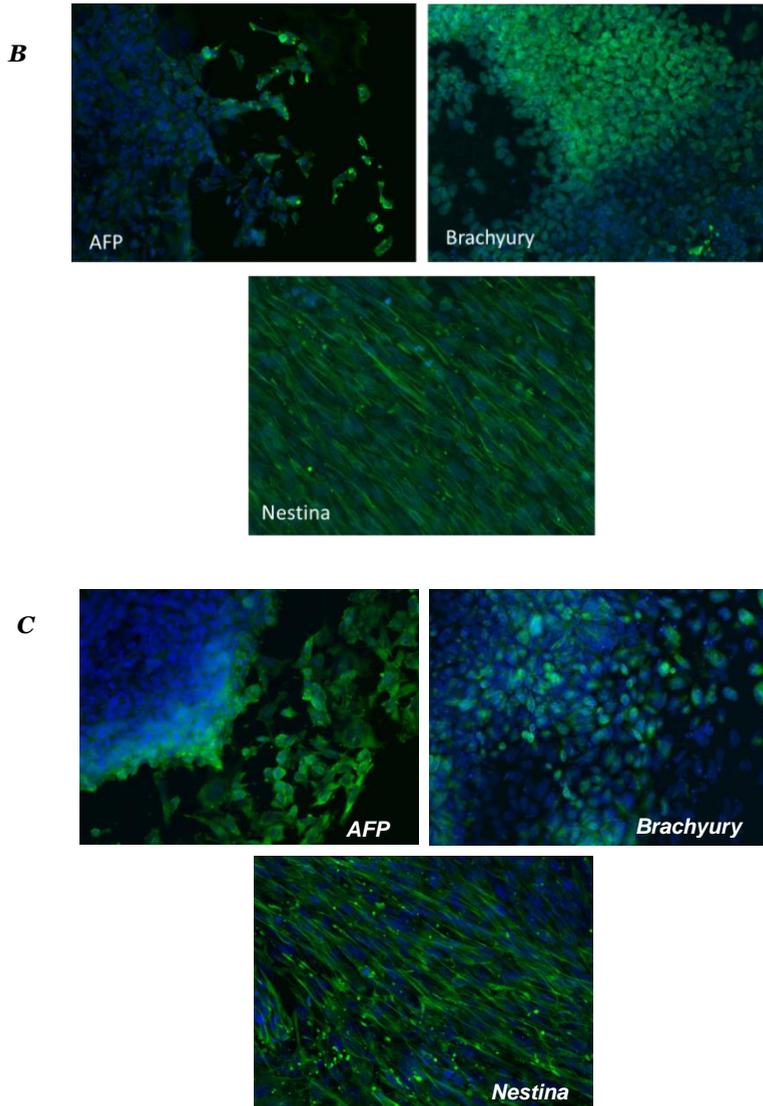


Figura 30. Analisi immunoistochimica dei marker di differenziazione sulle cellule iPS *oc/oc*. Livelli di espressione dei marker di differenziazione della linea iPS *oc/oc* #16.9 (A), #16.74 (B) e #13.62 (C): in ciascun pannello è indicata l'espressione dei vari marker data dalla sovrapposizione tra colorazione con DAPI e fluorescenza verde. Ingrandimento 40 X.

3.2. Correzione del difetto genetico delle linee iPS oc/oc

Dopo aver analizzato in maniera approfondita le caratteristiche di staminalità e di pluripotenza, sia *in vitro* che *in vivo*, dei cloni iPS oc/oc #16.9, #16.74 e #13.62, abbiamo proceduto alla correzione del difetto genetico in queste tre linee che hanno complessivamente fornito buoni risultati di caratterizzazione.

Le tre linee selezionate sono state corrette mediante ricombinazione omologa in seguito a trasfezione con un vettore BAC contenente il gene murino *wt* TCRG1 con le proprie sequenze regolatrici. A tale scopo, il vettore BAC RP24-241G10 è stato ingegnerizzato in modo da inserire una resistenza alla Neomicina che ci ha consentito di selezionare i cloni che hanno integrato il gene corretto.

Le cellule di ciascuno dei tre cloni sono state prelevate e fatte decantare per 30 minuti al fine di eliminare il feeder layer di MEF. Circa $2,2 \times 10^5$ cellule così trattate sono state seminate con terreno di coltura per ESC, in assenza di P/S, e successivamente trasfettate mediante lipofectamina con 1 µg di BAC per 24 h.

Il giorno dopo i cloni sono stati seminati su un feeder di cellule DR4 resistenti all'antibiotico neomicina, in presenza di un terreno per ESC contenente la Neomicina stessa ad una concentrazione iniziale pari a 200 µg/ml, utilizzata come agente selettivo per isolare i cloni contenenti il BAC con la resistenza. Nei giorni successivi è stata aumentata la concentrazione di antibiotico, portandola prima a 250 µg/ml e poi a 275 µg/ml.

Dopo circa 9 giorni i cloni sopravvissuti, resistenti all'antibiotico, sono stati prelevati e trasferiti nuovamente su feeder di DR4 con l'aggiunta di neomicina ad una concentrazione di 275 µg/ml ed amplificati. Questa

procedura di correzione ci ha permesso di ottenere 35 sottoclone per la linea #16.74, 41 sottoclone per la linea #13.62 e 10 per la linea #16.9.

3.2.1. Caratterizzazione dei cloni iPS oc/oc corretti

Tutti i sottoclone sono stati purificati sulla base dell'espressione della proteina SSEA1 mediante biglie magnetiche e tenuti in coltura in pozzetti trattati con gelatina per 3 passaggi, al fine di eliminare completamente le MEF che avrebbero potuto dare falsi positivi negli esperimenti successivi.

I cloni sono quindi stati analizzati a livello genomico, mediante PCR, per testare la presenza dell'allele wt, presupponendo che la correzione del difetto genetico sia avvenuta su un solo allele, e a livello del trascritto, mediante RT-PCR, per valutare la presenza del gene corretto TCRG1.

Va notato che questo tipo di analisi evidenziava sia i cloni in cui il BAC si era integrato mediante ricombinazione omologa nel locus TCRG1, sia quelli in cui si era integrato in maniera random in altre posizioni genomiche. In questo modo abbiamo potuto selezionare i cloni positivi ad entrambi i tipi di analisi per le tre linee (Tabella 25), che sono risultati essere la maggior parte, e che abbiamo successivamente testato tramite analisi FISH, effettuata su preparati metafasici fissati su vetrino, per verificare la corretta localizzazione del BAC sul cromosoma 19, utilizzando come sonda il vettore stesso (Figura 31).

Per la linea #13.62, abbiamo analizzato tramite FISH solo una parte dei sottoclone risultati positivi alle analisi di PCR, avendo deciso di interrompere lo screening dopo aver trovato il primo clone con la corretta localizzazione del BAC.

CLONI 16.74 BAC	PCR wt	RT PCR TCIRG1	FISH	CLONI 16.74 BAC	PCR wt	RT PCR TCIRG1	FISH
16	si	si	inserzione telomerica	25	si	si	inserzione telomerica
28	si	si	inserzione telomerica	26	si	si	inserzione telomerica
10	si	si	inserzione telomerica	3	si	si	inserzione telomerica
24	si	si	inserzione telomerica	19	si	si	inserzione telomerica
8	si	si	inserzione telomerica	17	si	si	inserzione telomerica
11	si	si	inserzione telomerica	2	no	no	-
34	si	si	riarrangiamento	12	si	si	inserzione telomerica
15	si	si	inserzione telomerica	35	no	no	-
7	si	si	inserzione telomerica	36	si	si	inserzione telomerica
31	si	si	inserzione telomerica	1	si	si	pop mista per fish
6	si	si	inserzione telomerica	4	si	si	cariotipo non buono XO
32	si	si	si	33	si	si	inserzione telomerica
23	no	no	-	5	si	si	inserzione telomerica
21	si	si	inserzione telomerica	18	si	si	inserzione telomerica
30	si	si	inserzione telomerica	20	si	si	riarrangiamento
27	si	no banda	inserzione telomerica	29	si	si	inserzione telomerica
14	si	si	Inserzione telomerica	13	no	no	-
9	si	si	inserzione telomerica				

CLONI 16.9 BAC	PCR wt	RT PCR TCIRG1	FISH
1	no	no	-
2	si	si	riarrangiamento
3	si	si	inserzione telomerica
4	no	no	-
5	si	si	inserzione telomerica
6	si	si	riarrangiamento
7	si	si	inserzione telomerica
8	si	si	riarrangiamento
9	si	si	inserzione telomerica
10	si	ok	riarrangiamento

Tabella 25. Analisi dei cloni corretti con il vettore BAC. Sotoclone delle linee corrette 16.74 e 16.9 risultanti positivi alle analisi di PCR ed analizzati per FISH.

Con questa analisi abbiamo ottenuto 1 sottoclone per la linea 16.74, che abbiamo chiamato 16.74 BAC 32 ed 1 sottoclone per la linea 13.62, chiamato 13.62 BAC 18, che mostravano una corretta localizzazione della sonda. La maggior parte dei sottocloni analizzati per FISH presentava, infatti, inserzioni del BAC a livello del telomero, su cromosomi diversi dal 19 e di conseguenza è stata scartata.

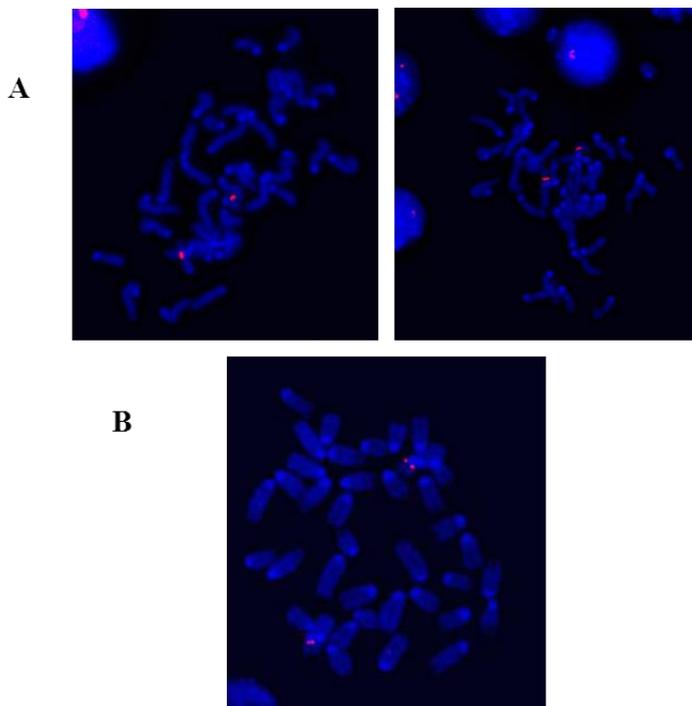


Figura 31. Analisi FISH per la localizzazione del BAC. Immagine di due metafasi del clone 16.74 BAC32 (A) e di una metafase del clone 13.62 BAC 18 (B) analizzate con saggio FISH. Il DNA è colorato con DAPI, in blu, mentre la sonda specifica per il vettore BAC è colorata in rosso.

La linea 16.9 che, invece, non ha fornito nessun sottoclone idoneo, per la presenza di inserzioni telomeriche e riarrangiamenti in tutti i cloni analizzati, è stata esclusa da ulteriori analisi e scartata.

L'analisi della distribuzione numerica dei cromosomi nelle due linee corrette ha dato una percentuale del 73% di metafasi con un normale set di 40 cromosomi per il clone 13.62 BAC 18 e dell'81% per il clone 16.74 BAC32, con assenza di riarrangiamenti visibili. Delle metafasi che presentavano una normale distribuzione cromosomica è stato ricostruito il cariotipo (Figura 32).

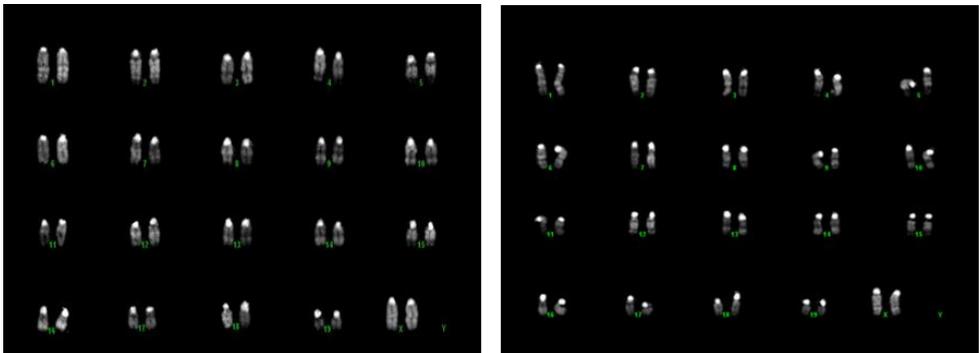


Figura 32. Analisi del cariotipo dei cloni corretti. A sinistra ricostruzione del cariotipo del clone 13.62 BAC 18 e a destra del clone 16.74 BAC32, con presenza di normali set di cromosomi.

I cloni corretti sono stati quindi caratterizzati dal punto di vista della pluripotenza mediante analisi immunocitochimiche per determinare i livelli di espressione dei diversi marker di staminalità, come descritto in precedenza. I cloni hanno mostrato elevati livelli di espressione di questi marker (Figura 33). Anche in questo caso, i fibroblasti embrionali di topo non trattati sono stati usati come controllo negativo.

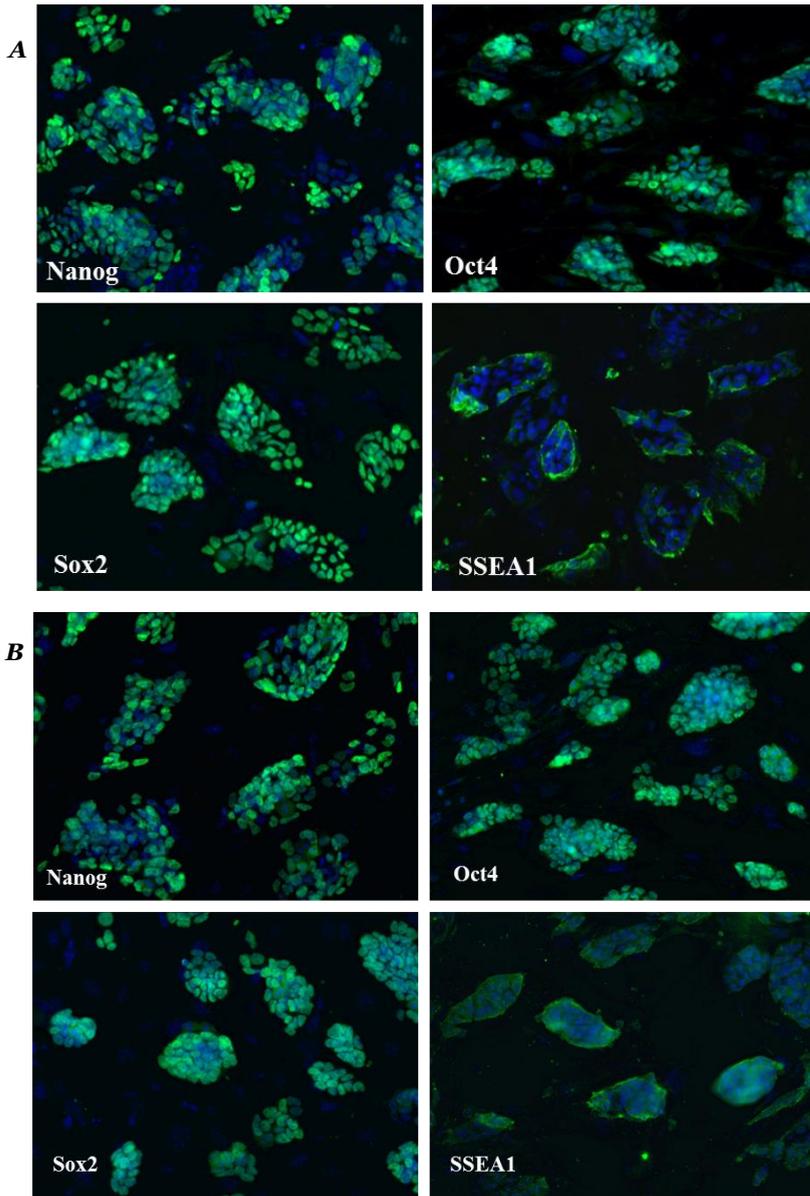


Figura 33. Immagini immunoistochimiche sulle cellule iPS corrette. Livelli di espressione dei marker di staminalità della linea corretta 13.62 BAC 18 (A) e 16.74 BAC 32 (B): in ciascun pannello è indicata l'espressione dei vari marker data dalla sovrapposizione tra colorazione con DAPI e fluorescenza verde. Ingrandimento 60 X.

L'espressione dei geni della pluripotenza è stato inoltre valutata mediante real-time PCR qualitativa e quantitativa. Come detto in precedenza, il cDNA dei cloni corretti è stato ottenuto dopo purificazione con biglie magnetiche specifiche per SSEA-1 e dopo aver sottoposto le cellule a tre passaggi in piastre trattate con gelatina, al fine di purificare completamente le cellule iPS dal substrato di MEF. Le linee cellulari staminali HM1 e le iPS *wt* #6.25.39 sono state utilizzate come controlli positivi.

I livelli di espressione, così analizzati, dei principali marker di pluripotenza Nanog, Oct4, Sox2 e Klf4 sono risultati generalmente simili a quelli delle linee di controllo (Figura 34).

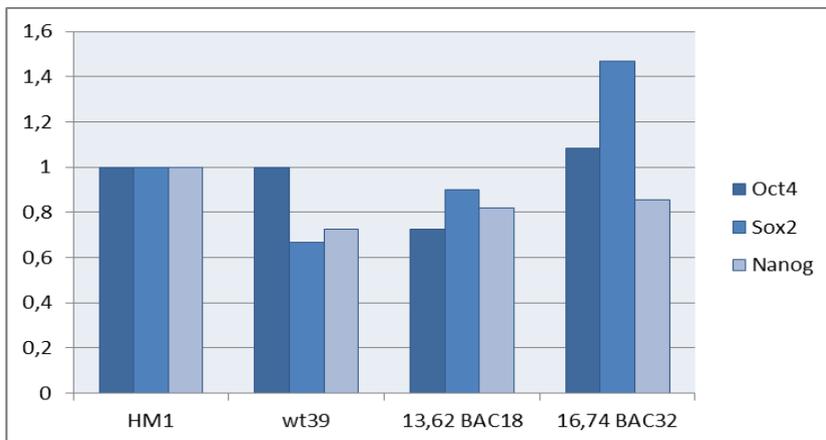


Figura 34. Real-time quantitative RT-PCR per la valutazione dell'espressione dei marker di pluripotenza nei cloni iPS oc/oc corretti 13.62 BAC 18 e 16.74 BAC 32. Gli istogrammi rappresentano le espressioni relative dei vari marker normalizzati sulle HM1 e confrontate con il clone iPS *wt* 6.25.39. Le barre indicano la deviazione standard.

Come ulteriore prova dell'acquisizione della pluripotenza da parte delle linee corrette ottenute, ne abbiamo testato la capacità di differenziarsi *in*

vivo, iniettando 5 milioni di cellule di ciascuno dei due cloni iPS in topi immunodeficienti. Le varie linee hanno portato alla formazione di noduli in seguito ad iniezione sottocutanea. L'analisi istologica dei tessuti dopo colorazione con ematossilina-eosina ha rilevato la presenza di teratomi con strutture derivanti da tutti e 3 i foglietti germinali embrionali a diversi stadi di differenziazione (Figura 35). Come in precedenza, i campioni istologici sono stati analizzati in cieco e confrontati con la linea cellulare riprogrammata iPS *wt* #6.25.39, usata come controllo positivo. Abbiamo analizzato due teratomi per ciascuna delle due linee. In tabella 26 sono indicati i punteggi del clone #16.74 BAC 32. I teratomi derivati dai cloni hanno mostrato punteggi simili a quelli generati dalle cellule HM1.

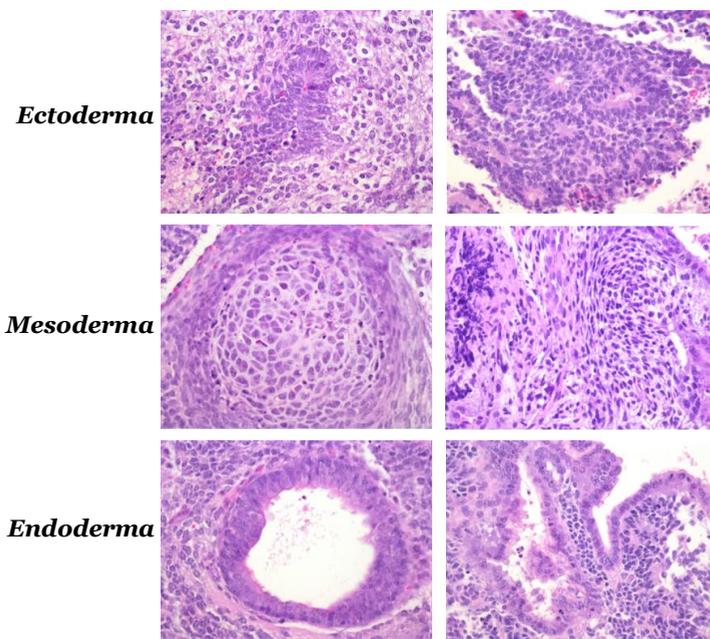


Figura 35. Immagini dei teratomi. Colorazione con ematossilina e eosina dei teratomi derivati dalle cellule iPS *oc/oc* corrette 16.74 BAC32 (pannelli a sinistra) e 13.62 BAC18 (pannelli a destra), mostranti tessuti istologici derivati dall'ectoderma (neuroepitelio maturo), tessuti derivati dal mesoderma (tessuto connettivo e

cartilagine) e tessuti derivati dall'endoderma (epitelio ciliato e strutture ghiandolari) ad ingrandimento 40X.

#	HM1		Wt 39		16.74 bac 32	
	PL 12/1911					
Mouse No.	27	28	29	30	31	32
Overall grade of maturation	2,5	2	1,5	2	2	1,5
Undifferentiated cells	-	+/-	+	-	+	+
Peripheral infiltration	-	+/-	+/-	-	+/-	ne
Trophoectodermal derivatives	-	-	+/-	+/-	-	-
Ectodermal derivatives						
Primitive neuroepithelium	+/-	+	+	+	+	+
Mature nervous tissue	+	+	+	+	+	+
Keratinized epithelium	-	-	-	-	-	-
Hairs and follicles	-	-	-	-	-	-
Mesodermal derivatives						
Connective tissue	+	+	+	+	+	+
Cartilage	+/-	+	+	+	+	+
Bone	-	+	-	-	-	-
Muscle (smooth and/or skeletal)	+	+	+	+	+	+
Adipose tissue	-	-	+/-	-	-	-
Endodermal derivatives						
Ciliated epithelium w/ or w/o goblet cells	+	+	+/-	-	+	+
Gland structures	-	+	+	+	+	+
Additional notes	Mature nervous tissue 80%	Mature nervous tissue 50%	Multifocal necro-hemorrhagic areas; suspect of hematopoietic cells	Mature nervous tissue 80%	Mature nervous tissue 70%	Multifocal hemorrhagic areas

ne=not evaluable

Tabella 26. Valutazione istologica dei teratomi. I punteggi assegnati ai campioni sono indicati nella parte alta della tabella. Come esempio sono riportate le valutazioni relative al clone corretto #16.74 BAC 32.

Come ulteriore dimostrazione di pluripotenza *in vivo* delle cellule iPS corrette, è stata indotta la formazione degli EBs che sono poi stati fatti differenziare nei tre foglietti germinali embrionali.

Gli EBs differenziati derivanti dai 2 cloni corretti sono stati analizzati tramite immunostochimica per i marker AFP, Brachyury e Nestina, specifici per endoderma, mesoderma ed ectoderma rispettivamente.

L'RNA estratto dalle cellule è stato, invece, analizzato tramite PCR per i seguenti marker di differenziazione, AFP e HNF per l'endoderma, Sox1 e Nestina per l'ectoderma, Flt1 e BMP2 per il mesoderma.

Entrambe le linee sono risultate positive per gli specifici marcatori analizzati, sia mediante RT-PCR (Figura 36) sia tramite immunohistochimica (Figura 37).

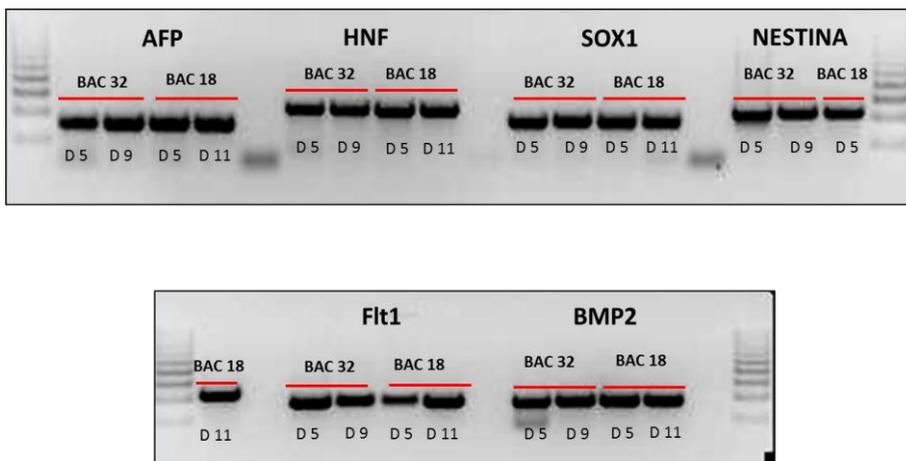


Figura 36. Analisi dell'espressione di vari marker di differenziazione dei cloni iPSc *oc/oc* corretti 13.62 BAC18 e 16.74 BAC32. Con D5, D9 e D11 sono indicati i giorni di differenziazione in corrispondenza dei quali è stata analizzata l'espressione dei marker.

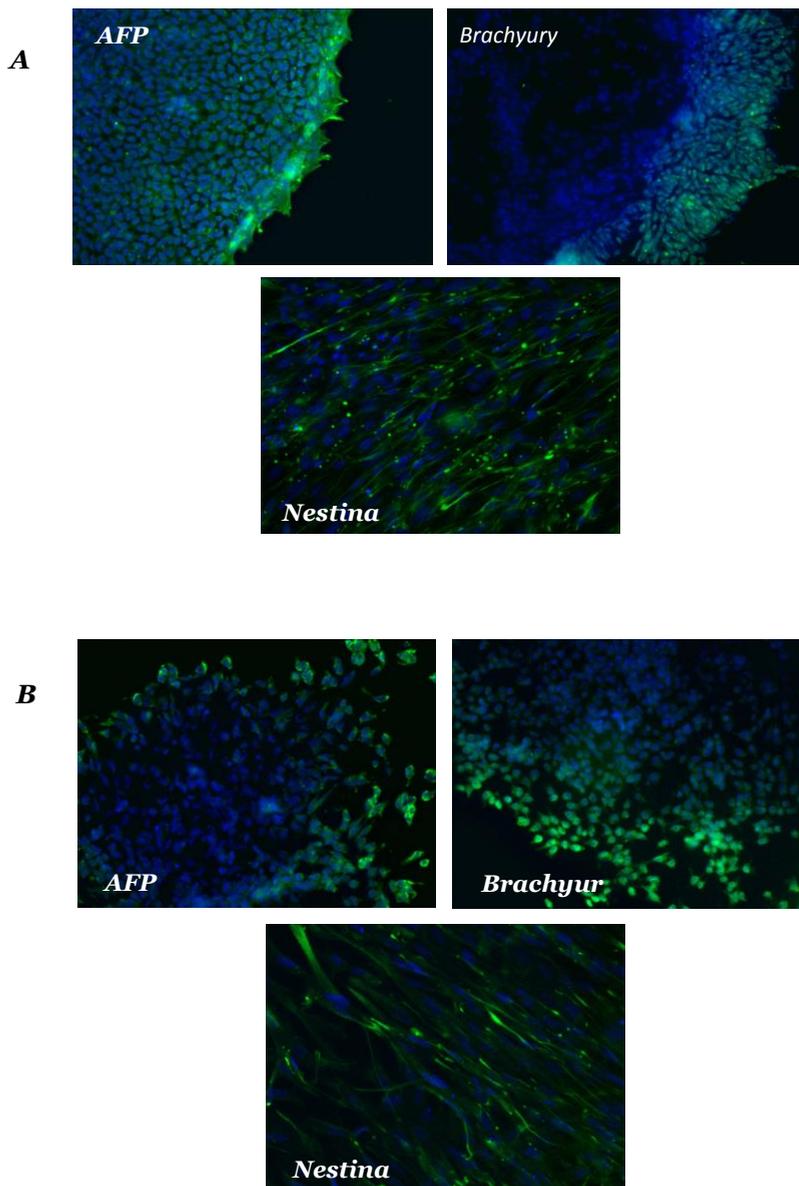


Figura 37. Analisi immunoistochimica dei marker di differenziazione sulle cellule iPS oc/oc corrette. Livelli di espressione dei marker di differenziazione delle linee iPS oc/oc corrette #32 (A) e #18 (B): in ciascun pannello è indicata l'espressione dei vari marker data dalla sovrapposizione tra colorazione con DAPI e fluorescenza verde. Ingrandimento 40 X.

4. DISCUSSIONE

Le ESC rappresentano un potenziale strumento di grande utilità nella medicina rigenerativa per la loro peculiare proprietà di generare tutti i tipi cellulari di un individuo ed hanno, infatti, trovato largo impiego in numerosi studi animali [6], nonché in studi clinici umani, ad esempio quelli sulla malattia di Parkinson [7] e sulla degenerazione della retina [8].

Tuttavia l'uso delle ESC umane è ostacolato da numerose difficoltà, sia di natura tecnica, come la reperibilità o la necessità di immunocompatibilità, sia di natura etica, in quanto il loro utilizzo prevede la distruzione degli embrioni [9,10].

In quest'ottica, l'utilizzo delle cellule iPS costituisce una valida alternativa terapeutica all'impiego delle ESC.

Le iPSc sono cellule somatiche adulte riprogrammate allo stadio staminale mediante l'espressione forzata di specifici fattori di trascrizione [23] che conferisce loro le stesse caratteristiche di pluripotenza delle ESC, permettendone l'uso nel trattamento di varie malattie, ma escludendo il rischio di rigetto in quanto derivate dal paziente stesso. In particolare, le patologie che necessitano di HSCT potrebbero essere trattate in maniera vantaggiosa con il trapianto di iPSC autologhe.

Per questi motivi, nel presente lavoro di Tesi abbiamo deciso di sfruttare le peculiari caratteristiche delle iPSC nel trattamento dell'Osteopetrosi, che è una malattia delle ossa curabile, ad oggi, solo con HSCT da donatori eterologhi.

I pazienti osteopetrotici potrebbero infatti beneficiare significativamente del trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe corrette, capaci di ricostituire un sistema ematopoietico compromesso [130].

Inizialmente abbiamo generato iPSc da topi *wt* e in seguito da fibroblasti di topi osteopetrolici *oc/oc*, che costituiscono un modello murino della malattia utile per valutare nuovi approcci terapeutici nell'uomo.

Per trasferire ai fibroblasti murini i geni riprogrammanti Oct4, Sox2 e Klf4, abbiamo utilizzato, inizialmente, due vettori e siamo passati poi ad un singolo vettore lentivirale policistronico. Questo tipo di vettore si integra nel genoma dell'ospite, ma può essere eliminato dopo la fase di riprogrammazione grazie alla presenza di due siti loxP, situati alle estremità del vettore stesso, che guidano l'attività ricombinante della proteina Cre e che, in aggiunta all'assenza dell'oncogene c-Myc nel nostro caso, conferiscono al vettore impiegato un buon grado di sicurezza.

Abbiamo ottenuto iPSc con la stessa efficienza descritta in letteratura e ad un livello paragonabile tra le due diverse linee *wt* e *oc/oc*. Tra tutte le iPSc *wt* generate abbiamo selezionato 2 cloni (iPSc *wt* #6.25.39 e #6.25.68), mentre per le iPSc *oc/oc* siamo stati in grado di ottenere 4 linee (iPS *oc/oc* #16.6, #16.9, #13.62 e #16.74) delle quali 2, con le migliori caratteristiche di staminalità e stabilità genomica, sono state corrette.

Più in dettaglio, abbiamo preliminarmente analizzato e selezionato tutti i cloni ottenuti, sia *wt* che *oc/oc*, sulla base dell'elevata percentuale di metafasi con un normale numero di cromosomi e sulla base dell'assenza di vettori integrati.

L'utilizzo di un singolo vettore lentivirale policistronico ci ha permesso di migliorare significativamente gli iniziali problemi che si erano presentati a causa dell'impiego di due vettori LV: le prime iPSc *wt* ottenute mostravano, infatti, un genoma con un numero aberrante di cromosomi e con frequenti riarrangiamenti. Devono essere tuttavia considerati altri fattori, come il prolungato mantenimento delle cellule in coltura, il ripetuto uso della tripsina e l'attività della Cre impiegata per l'eliminazione del vettore, che

potrebbero giustificare la mancata diretta correlazione tra il VCN delle cellule e la presenza di anomalie cromosomiche nei cloni stessi.

Inoltre, pur avendo migliorato notevolmente l'efficienza di ottenimento di cloni privi di vettori e con un cariotipo normale, applicando modifiche al protocollo di riprogrammazione, va considerato che la frequenza di cloni utili ai nostri scopi, ulteriormente processabili, tra tutte le linee iPS analizzate, è risultata comunque molto bassa, ma in linea con la resa delle metodiche utilizzate nei vari laboratori.

Una volta selezionati i cloni, ne abbiamo analizzato l'espressione dei principali marker di staminalità, quali Nanog, Oct4, Sox2 e SSEA-1 mediante immunostochimica, mentre la fosfatasi alcalina è stata investigata tramite staining.

Da rimarcare che i livelli di espressione sono risultati confrontabili con quelli delle E14, una linea embrionale usata come controllo positivo, e nettamente più elevati rispetto alle MEF, usate come controllo negativo.

Abbiamo inoltre valutato l'espressione dei geni della pluripotenza tramite quantitative real-time RT-PCR testando vari marker, compresi i geni usati per la riprogrammazione.

Analisi più approfondite sono state effettuate sul genoma delle varie linee, mostrando l'ottenimento di un cariotipo normale senza riarrangiamenti.

Per dimostrare definitivamente la pluripotenza dei nostri cloni, sono stati eseguiti esperimenti di controllo *in vivo*, tramite il saggio di formazione dei teratomi in seguito ad iniezioni sottocutanee delle iPSc in topi nudi e verificando poi la formazione di masse tumorali composte di tessuti derivati da tutti e tre i foglietti embrionali primari.

I cloni iPS *oc/oc* selezionati sono stati caratterizzati anche mediante un ulteriore saggio di differenziamento *in vitro*, tenendo conto di quella che è una caratteristica distintiva delle ESC, nonché dimostrazione di

pluripotenza delle cellule riprogrammate iPS, ossia la capacità di formare corpi embrioidi (EBs) differenziabili nei tre foglietti germinali embrionali.

Per attuare tale controllo abbiamo differenziato le linee con il metodo delle *hanging drops* e in seguito valutato mediante immunostochimica l'espressione dei marcatori specifici di tutti e tre i tessuti primari che le linee differenziate hanno generato.

Nella seconda parte del lavoro, dopo aver analizzato in maniera approfondita le caratteristiche di staminalità e di pluripotenza, sia *in vitro* che *in vivo*, dei cloni iPS *oc/oc* ottenuti, abbiamo proceduto alla correzione del difetto genetico nelle tre linee che hanno fornito i migliori risultati di caratterizzazione.

Le tre linee selezionate sono state corrette mediante ricombinazione omologa in seguito a trasfezione con un vettore BAC contenente il gene murino *wt* TCRG1, principale responsabile dell'osteopetrosi ARO.

I sottoclone sono stati selezionati grazie alla presenza della resistenza all'antibiotico Neomicina introdotto nel vettore BAC a tal fine ingegnerizzato; i cloni così selezionati sono stati analizzati per la presenza del gene *wt* TCRG1 mediante RT PCR, mentre l'effettiva presenza e la corretta localizzazione del vettore stesso nelle linee iPS sono state confermate mediante indagine FISH.

Degno di nota il fatto che la quasi totalità dei cloni sottoposti a screening mostrava la presenza dell'allele *wt* del gene TCRG1, ma solo una piccola percentuale di essi mostrava poi una corretta ricombinazione omologa nello specifico locus del gene, a causa di un'elevata percentuale di integrazioni casuali nel genoma. Tutto ciò ha inizialmente reso molto laborioso questo tipo di screening e ci ha indotto, nel corso dell'analisi del secondo clone, ad interrompere la selezione subito dopo aver identificato il primo clone con la corretta localizzazione del BAC.

Tutto ciò ha portato all'identificazione di 2 linee corrette idonee, chiamate BAC 32 e BAC 18, che sono state sottoposte a tutti i controlli già effettuati in precedenza per gli altri cloni.

Dopo essere stati analizzati dal punto di vista citogenetico per assicurarci della presenza di un normale corredo cromosomico, i cloni sono stati saggiati per la pluripotenza, verificata mediante analisi immunocitochimiche e di RT quantitative PCR per determinare i livelli di espressione dei diversi marker.

Come ulteriore dimostrazione di pluripotenza *in vitro*, le cellule iPS corrette sono state differenziate nei tre foglietti germinali embrionali in seguito a formazione di EBs e l'espressione dei marker specifici è stata verificata mediante immunocitochimica e RT-PCR.

La dimostrazione principe dell'acquisizione della pluripotenza da parte delle linee corrette, è stata ottenuta testandone la capacità di differenziarsi *in vivo*, mediante iniezione in topi immunodeficienti e conseguente ottenimento di teratomi con strutture derivanti da tutti e tre i foglietti germinali.

5. CONCLUSIONI

Nella presente tesi ho utilizzato la tecnologia delle iPSc in un modello murino (ceppo *oc/oc*) di una grave malattia umana, l'osteopetrosi, allo scopo di dimostrare in linea di principio che è possibile correggere un difetto genetico in cellule che possono essere poi stimolate a differenziarsi in cellule mature, che potrebbero venir utilizzate per la terapia genico/cellulare.

Il ceppo *oc/oc* ricapitola in maniera molto fedele non solo gli aspetti patogenetici dell'osteopetrosi umana dipendente da un difetto della pompa protonica ATPasica, ma ne riproduce anche il quadro clinico, dal momento che la malattia sia nell'uomo che nel topo mostra alterazioni scheletriche, anemia, epatosplenomegalia e difetti neurologici dovuti a compressione dei nervi cranici. Entrambe le forme, umana e murina, possono essere curate mediante trapianto di midollo osseo, e questo costituisce la base del presente approccio mediante iPSc. Queste ultime infatti potranno essere forzate a differenziarsi verso la linea ematopoietica, producendo cellule mature tra cui gli osteoclasti che sono appunto le cellule difettose in questo tipo di osteopetrosi.

Pur non essendo, al momento attuale, disponibile un protocollo ben definito per la differenziazione verso le cellule staminali ematopoietiche, i risultati riportati nella presente tesi costituiscono un primo passo verso la correzione del difetto genetico che sta alla base di questa grave malattia umana, la cui terapia resta ancora insoddisfacente.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 Hanna, J.H., Saha, K., Jaenisch, R., 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508–525.
- 2 Evans, M.J., and M.H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292:154-156.
- 3 Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C., Ratnam, S., 1994. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum. Reprod.* 9, 2110–2117.
- 4 Thomson, J.A., Itskovitz -Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.S., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- 5 Cowan, C.A., I. Klimanskaya, J. McMahon, J. Atienza, J. Witmyer, J.P. Zucker, S. Wang, C.C. Morton, A.P. McMahon, D. Powers, and D.A. Melton. 2004. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. In *N Engl J Med*. Vol. 350, United States. 1353-1356.
- 6 Keirstead, H.S., G. Nistor, G. Bernal, M. Totoiu, F. Cloutier, K. Sharp, and O. Steward. 2005. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. In *J Neurosci*. Vol. 25, United States. 4694-4705.
- 7 Yang, J.R., C.H. Liao, C.Y. Pang, L.L. Huang, Y.T. Lin, Y.L. Chen, Y.L. Shiue, and L.R. Chen. 2010. Directed differentiation into neural lineages and therapeutic potential of porcine embryonic stem cells in rat Parkinson's disease model. *Cell Reprogram.* 12:447-461.
- 8 Lamba, D.A., M.O. Karl, and T.A. Reh. 2009. Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration. In *Prog Brain Res*. Vol. 175, Netherlands. 23-31.
- 9 Sugarman, J. 2008. Human stem cell ethics: beyond the embryo. In *Cell Stem Cell*. Vol. 2, United States. 529-533.
- 10 Swijnenburg, R.J., S. Schrepfer, F. Cao, J.I. Pearl, X. Xie, A.J. Connolly, R.C. Robbins, and J.C. Wu. 2008. In vivo imaging of embryonic stem cells reveals patterns of survival and immune rejection following transplantation. *Stem Cells Dev.* 17:1023-1029.
- 11 Gurdon, J.B., 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10, 622–640.
- 12 Hochedlinger, K., and R. Jaenisch. 2006. Nuclear reprogramming and pluripotency. In *Nature*. Vol. 441, England. 1061-1067.

- 13 Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, and K.H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-813.
- 14 Winston, R., 1997. The promise of cloning for human medicine. *BMJ* 314, 913–914.
- 15 Cowan, C.A., J. Atienza, D.A. Melton, and K. Eggan. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. In *Science*. Vol. 309, United States. 1369-1373.
- 16 Silva, J., Chambers, I., Pollard, S., Smith, A., 2006. Nanog promotes transfer of pluripotency
- 17 Pralong, D., Trounson, A.O., Verma, P.J., 2006. Cell fusion for reprogramming pluripotency:
- 18 Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.
- 19 Yamanaka, S., and Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712.
- 20 Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation.
- 21 Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145-1147.
- 22 Masip, M., Veiga, A., Izpisua Belmonte, J.C., Simon, C., 2010. Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol.Hum. Reprod.* 16, 856–868.
- 23 Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676
- 24 Takahashi, K., et al., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- 25 Yu, J., et al., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- 26 H. Niwa, J. I. Miyazaki, and A. G. Smith, “Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells,” *Nature Genetics*, vol. 24, no. 4, pp. 372–376, 2000.
- 27 H. Niwa, “Molecular mechanism for cell-fate determination in ES cells,” *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, vol. 45, no. 13, supplement, pp. 2047–2055, 2000.
- 28 D. J. Rodda, J. L. Chew, L. H. Lim et al., “Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 26, pp. 24731–24737, 2005.
- 29 M. Bullejos, R. D. D. L. Guardia, M. J. L. Barragán, and A. Sánchez, “HMG-box sequences from microbats homologous to

- the human SOX30 HMG-box,” *Genetica*, vol. 110, no. 2, pp. 157–162, 2000.
- 30 Z. Wei, Y. Yang, P. Zhang et al., “Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming,” *Stem Cells*, vol. 27, no. 12, pp. 2969–2978, 2009.
 - 31 J. Hall, G. Guo, J. Wray et al., “Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal,” *Cell Stem Cell*, vol. 5, no. 6, pp. 597–609, 2009.
 - 32 M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe et al., “Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts,” *Nature Biotechnology*, vol. 26, no. 1, pp. 101–106, 2008.
 - 33 J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto et al., “Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells” *Science*, vol. 318, no. 5858, pp. 1917–1920, 2007.
 - 34 E. E. Kohler, C. E. Cowan, I. Chatterjee, A. B. Malik, and K. K. Wary, “NANOG induction of fetal liver kinase-1 (FLK1) transcription regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis,” *Blood*, vol. 117, no. 5, pp. 1761–1769, 2011.
 - 35 I. Heo, C. Joo, J. Cho, M. Ha, J. Han, and V. N. Kim, “Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA,” *Molecular Cell*, vol. 32, no. 2, pp. 276–284, 2008.
 - 36 K. Okita, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, “Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells,” *Nature*, vol. 448, no. 7151, pp. 313–317, 2007.
 - 37 Wernig, M., et al., 2008. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat. Biotechnol.* 26, 916–924.
 - 38 Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324:797–801.
 - 39 Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K., 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
 - 40 Zhou W, Freed CR. 2009. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27:2667–2674.
 - 41 Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. 2009. Efficient induction of transgene free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:348–362.
 - 42 Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki

- N, Hasegawa M, Fukuda K. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7:11–14.
- 43 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322:949–953.
- 44 Yamanaka, S. 2009. A fresh look at iPS cells. In *Cell*. Vol. 137, United States. 13-17.
- 45 Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(1):189-93.
- 46 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5):618-30.
- 47 Martinez, N.J., and R.I. Gregory. 2010. MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. In *Cell Stem Cell*. Vol. 7. 2010 Elsevier Inc, United States. 31-35.
- 48 Mallanna, S.K., and A. Rizzino. 2010. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. In *Dev Biol*. Vol. 344. 2010 Elsevier Inc, United States. 16-25.
- 49 Anokye-Danso, F., C.M. Trivedi, D. Juhr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P.J. Gruber, J.A. Epstein, and E.E. Morrissey. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. In *Cell Stem Cell*. Vol. 8. 2011 Elsevier Inc, United States. 376-388.
- 50 Miyoshi, N., H. Ishii, H. Nagano, N. Haraguchi, D.L. Dewi, Y. Kano, S. Nishikawa, M. Tanemura, K. Mimori, F. Tanaka, T. Saito, J. Nishimura, I. Takemasa, T. Mizushima, M. Ikeda, H. Yamamoto, M. Sekimoto, Y. Doki, and M. Mori. 2011. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. In *Cell Stem Cell*. Vol. 8. 2011 Elsevier Inc, United States. 633-638.
- 51 Subramanyam, D., S. Lamouille, R.L. Judson, J.Y. Liu, N. Bucay, R. Derynck, and R. Blelloch. 2011. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. In *Nat Biotechnol*. Vol. 29, United States. 443-448.
- 52 Montini, E., D. Cesana, M. Schmidt, F. Sanvito, M. Ponzoni, C. Bartholomae, L. Sergi Sergi, F. Benedicenti, A. Ambrosi, C. Di Serio, C. Doglioni, C. von Kalle, and L. Naldini. 2006. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse

- model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. In *Nat Biotechnol.* Vol. 24, United States. 687-696.
- 53 Abremski, K., and R. Hoess. 1984. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem.* 259:1509-1514.
 - 54 Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; 136(5): 964-77.
 - 55 Ramos-Mejia V, Montes R, Bueno C, et al. Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors. *PLoS One* 2012; 7(4): e35824.
 - 56 Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, et al. Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(5): 1042-9.
 - 57 Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458:771–775.
 - 58 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766–770.
 - Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM. 2006. Gene therapy: Therapeuti.
 - 59 Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. 2009. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6:363–369.
 - Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng
 - 60 Wilson MH, Coates CJ, George AL, Jr. 2007. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* 15:139–145.
 - 61 Wang W, Lin C, Lu D, Ning Z, Cox T, Melvin D, Wang X, Bradley A, Liu P. 2008. Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9290–9295.
 - 62 Stadtfeld, M., Hochedlinger, K., 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 24, 2239–2263.
 - 63 Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
 - 64 Shi, Y., C. Desponds, J.T. Do, H.S. Hahm, H.R. Scholer, and S. Ding. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. In *Cell Stem Cell.* Vol. 3, United States. 568-574.

- 65 Huangfu, D., K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein, and D.A. Melton. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. In *Nat Biotechnol.* Vol. 26, United States. 1269-1275.
- 66 Bonizzi, G., Cicalese, A., Insinga, A., Pelicci, P.G., 2012. The emerging role of p53 in stem cells. *Trends Mol. Med.* 18, 6–12.
- 67 Kawamura, T., et al., 2009. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144.
- 68 Marion, R.M., et al., 2009. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149–1153.
- 69 Kim, J., et al., 2011. Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors. *Stem Cells* 29, 992–1000.
- 70 Li C, Zhou J, Shi G, Ma Y, Yang Y, Gu J, Yu H, Jin S, Wei Z, Chen F et al (2009) Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet* 18:4340-4349
- 71 Li, H., et al., 2012. p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 11, 845–852.
- 72 Marqués-Torrejón, M.A., Porlan, E., Banito, A., Gómez-Ibarlucea, E., Lopez-Contreras, A.J., Fernández-Capetillo, O., Vidal, A.R., Gil, J., Torres, J., Farinas, I., 2013. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell* 12(1), 88–100
- 73 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872
- 74 De Carvalho, D.D., You, J.S., Jones, P.A., 2010. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol.* 20, 609–617
- 75 Mikkelsen, T.S., et al., 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49–55.
- 76 Wang, T., et al., 2011. The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 9, 575–587.
- 77 Chen, J., et al., 2012. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat. Genet.* 45 (1), 34–43.
- 78 Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122:3502-3510
- 79 Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Doney SN, Resar LM, Zou C, Zhang YA, Tong J, Cheng L (2011) Efficient human iPS cell

- derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res* 21:518-529.
- 80 Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S et al (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5:434-44.
 - 81 Kunisato A, Wakatsuki M, Shinba H, Ota T, Ishida I, Nagao K (2011) Direct generation of induced pluripotent stem cells from human nonmobilized blood. *Stem Cells Dev* 20:159-168
 - 82 Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113:5476-5479
 - 83 Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, Li W, Weng Z, Chen J, Ni S et al (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6:71-79
 - 84 Yu J, Chau KF, Vodyanik MA, Jiang J, Jiang Y (2011) Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PLoS One* 6:e17557
 - 85 Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F et al (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8:633-638
 - 86 Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT et al (2009) Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15720-15725
 - 87 Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ et al (2011) Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* 13:541-549
 - 88 Wolfrum K, Wang Y, Prigione A, Sperling K, Lehrach H, Adjaye J (2010) The LARGE principle of cellular reprogramming: lost, acquired and retained gene expression in foreskin and amniotic fluid-derived human iPS cells. *PLoS One* 5:e13703
 - 89 Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW (2009) Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9826-9830
 - 90 Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC (2010) Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One* 5:e8975

- 91 Hu Q, Friedrich AM, Johnson LV, Clegg DO (2010) Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells* 28:1981-1991
- 92 Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR (2009) Transcriptional signature and memory retention of human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 4:e7076
- 93 Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E.M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I.H., Yu, J., et al. (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat. Biotechnol.* 27, 353–360.
- 94 Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., et al. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 41, 1350–1353
- 95 Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011b). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1117–1119.
- 96 Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73.
- 97 Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J., et al. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat. Cell Biol.* 13, 541–549.
- 98 Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 249–257.
- 99 Newman, A.M., and Cooper, J.B. (2010). Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 258–262.
- 100 Bar-Nur, O., Russ, H.A., Efrat, S., et al. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 9, 17–23.
- 101 Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, Zhang SC. 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem

- cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:4335–4340.
- 102 Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Wainger BJ, Williams DJ, Kahler DJ, Yamaki M, Davidow L, Rodolfa CT, Dimos JT, Mikkilineni S, MacDermott AB, Woolf CJ, Henderson CE, Wichterle H, Eggan K. *Nat Biotechnol.* 2011 Mar;29(3):279-86.
- 103 Carey BW, Markoulaki S, Hanna JH, Faddah DA, Buganim Y, Kim J, Ganz K, Steine EJ, Cassady JP, Creighton MP, Welstead GG, Gao Q, Jaenisch R. 2011. Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 9:588–598.
- 104 Stadtfeld M, Hochedlinger K. 2010. Induced pluripotency: History, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24:2239–2263.
- 105 Cheng, L., Hansen, N.F., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F.X., Chou, B.K., Zhou, G., Li, S., Doney, S.N., et al; NISC Comparative Sequencing Program. (2012). Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by non integrating plasmid expression. *Cell Stem Cell*.10, 337-344
- 106 Young, M.A., Larson, D.E., Sun, C.W., George, D.R., Ding, L., Miller, C.A., Lin, L., Pawlik, K.M., Chen, K., Fan, X., et al. (2012). Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, in press.
- 107 Zhao, T., Z.N. Zhang, Z. Rong, and Y. Xu. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. In *Nature*. Vol. 474, England. 212-215.
- 108 Yamanaka, S. 2009. A fresh look at iPS cells. In *Cell*. Vol. 137, United States. 13-17.
- 109 Boskey, A.L. 1989. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Miner.* 6:111-123.
- 110 Hadjidakis, D.J., and Androulakis, II. 2006. Bone remodeling. In *Ann N Y Acad Sci*. Vol. 1092, United States. 385-396.
- 111 Martin, T.J., and N.A. Sims. 2005. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. In *Trends Mol Med*. Vol. 11, England. 76-81.
- 112 Suda, T., N. Takahashi, and T.J. Martin. 1992. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev.* 13:66-80.
- 113 Roodman, G.D. 1991. Osteoclast differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2:389-409.
- 114 Drake, F.H., R.A. Dodds, I.E. James, J.R. Connor, C. Debouck, S. Richardson, E. Lee-Rykaczewski, L. Coleman, D. Rieman, R. Barthlow, G. Hastings, and M. Gowen. 1996. Cathepsin K, but not

- cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem.* 271:12511-12516.
- 115Kenny, A.D. 1985. Role of carbonic anhydrase in bone: partial inhibition of disuse atrophy of bone by parenteral acetazolamide. *Calcif Tissue Int.* 37:126-133.
- 116Schlesinger, P.H., H.C. Blair, S.L. Teitelbaum, and J.C. Edwards. 1997. Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J Biol Chem.* 272:18636-18643.
- 117Ducy, P., T. Schinke, and G. Karsenty. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. In *Science*. Vol. 289, United States. 1501-1504.
- 118Manolagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 21:115-137.
- 119Villa, A., M.M. Guerrini, B. Cassani, A. Pangrazio, and C. Sobacchi. 2009. Infantile malignant, autosomal recessive osteopetrosis: the rich and the poor. *Calcif Tissue Int.* 84:1-12.
- 120Cohen, M.M., Jr. 2006. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A.* 140:2646-2706.
- 121Janssens, K., P. ten Dijke, S. Janssens, and W. Van Hul. 2005. Transforming growth factor-beta1 to the bone. In *Endocr Rev.* Vol. 26, United States. 743-774.
- 122Koay, M.A., and M.A. Brown. 2005. Genetic disorders of the LRP5-Wnt signalling pathway affecting the skeleton. In *Trends Mol Med.* Vol. 11, England. 129-137.
- 123Rosen, C.J. 2003. Insulin-like growth factor I and calcium balance: evolving concepts of an evolutionary process. In *Endocrinology.* Vol. 144, United States. 4679-4681.
- 124Rodan, G.A., and T.J. Martin. 1981. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 33:349-351
- 125Fuller, K., J.M. Owens, C.J. Jagger, A. Wilson, R. Moss, and T.J. Chambers. 1993. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med.* 178:1733-1744.
- 126Woo, J.T., M. Kato, M. Takami, and K. Nagai. 2000. Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the fusion of mononuclear preosteoclasts into multinucleated osteoclasts. *Cytotechnology.* 33:203-211.
- 127Lacey, D.L., E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S.

- Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W.J. Boyle. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. In *Cell*. Vol. 93, United States. 165-176.
- 128 Theill, L.E., W.J. Boyle, and J.M. Penninger. 2002. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. In *Annu Rev Immunol*. Vol. 20, United States. 795-823.
- 129 Del Fattore, A., A. Cappariello, and A. Teti. 2008. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. In *Bone*. Vol. 42, United States. 19-29.
- 130 Steward, C.G. 2010. Hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis. In *Pediatr Clin North Am*. Vol. 57. 2010 Elsevier Inc, United States. 171-180.
- 131 Wilson, C.J., and A. Vellodi. 2000. Autosomal recessive osteopetrosis: diagnosis, management, and outcome. *Arch Dis Child*. 83:449-452.
- 132 Stark, Z., and R. Savarirayan. 2009. Osteopetrosis. In *Orphanet J Rare Dis*. Vol. 4, England. 5.
- 133 Guerrini, M.M., C. Sobacchi, B. Cassani, M. Abinun, S.S. Kilic, A. Pangrazio, D. Moratto, E. Mazzolari, J. Clayton-Smith, P. Orchard, F.P. Coxon, M.H. Helfrich, J.C. Crockett, D. Mellis, A. Vellodi, I. Tezcan, L.D. Notarangelo, M.J. Rogers, P. Vezzoni, A. Villa, and A. Frattini. 2008. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. In *Am J Hum Genet*. Vol. 83, United States. 64-76.
- 134 Sobacchi, C., A. Frattini, M.M. Guerrini, M. Abinun, A. Pangrazio, L. Susani, R. Bredius, G. Mancini, A. Cant, N. Bishop, P. Grabowski, A. Del Fattore, C. Messina, G. Errigo, F.P. Coxon, D.I. Scott, A. Teti, M.J. Rogers, P. Vezzoni, A. Villa, and M.H. Helfrich. 2007. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. In *Nat Genet*. Vol. 39, United States. 960-962.
- 135 Venta, P.J., R.J. Welty, T.M. Johnson, W.S. Sly, and R.E. Tashian. 1991. Carbonic anhydrase II deficiency syndrome in a Belgian family is caused by a point mutation at an invariant histidine residue (107 His-Tyr): complete structure of the normal human CA II gene. *Am J Hum Genet*. 49:1082-1090.
- 136 Bolt, R.J., J.M. Wennink, J.I. Verbeke, G.N. Shah, W.S. Sly, and A. Bokenkamp. 2005. Carbonic anhydrase type II deficiency. *Am J Kidney Dis*. 46:A50, e71-53.
- 137 Frattini, A., P.J. Orchard, C. Sobacchi, S. Giliani, M. Abinun, J.P. Mattsson, D.J. Keeling, A.K. Andersson, P. Wallbrandt, L. Zecca, L.D. Notarangelo, P. Vezzoni, and A. Villa. 2000. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a

- subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet.* 25:343-346.
- 138 Stevens, T.H., and M. Forgac. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:779-808.
- 139 Toyomura, T., Y. Murata, A. Yamamoto, T. Oka, G.H. Sun-Wada, Y. Wada, and M. Futai. 2003. From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺ -ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation. In *J Biol Chem.* Vol. 278, United States. 22023-22030.
- 140 Kornak, U., D. Kasper, M.R. Bosl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, and T.J. Jentsch. 2001. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. In *Cell.* Vol. 104, United States. 205-215.
- 141 Meadows, N.A., S.M. Sharma, G.J. Faulkner, M.C. Ostrowski, D.A. Hume, and A.I. Cassady. 2007. The expression of *Clcn7* and *Ostm1* in osteoclasts is coregulated by microphthalmia transcription factor. In *J Biol Chem.* Vol. 282, United States. 1891-1904.
- 142 Chalhoub, N., N. Benachenhou, V. Rajapurohitam, M. Pata, M. Ferron, A. Frattini, A. Villa, and J. Vacher. 2003. Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. In *Nat Med.* Vol. 9, United States. 399-406.
- 143 Pressey, S.N., K.J. O'Donnell, T. Stauber, J.C. Fuhrmann, J. Tynnela, T.J. Jentsch, and J.D. Cooper. 2010. Distinct neuropathologic phenotypes after disrupting the chloride transport proteins *CIC-6* or *CIC-7/Ostm1*. In *J Neuropathol Exp Neurol.* Vol. 69, United States. 1228-1246.
- 144 Pangrazio, A., P.L. Poliani, A. Megarbane, G. Lefranc, E. Lanino, M. Di Rocco, F. Rucci, F. Lucchini, M. Ravanini, F. Facchetti, M. Abinun, P. Vezzoni, A. Villa, and A. Frattini. 2006. Mutations in *OSTM1* (grey lethal) define a particularly severe form of autosomal recessive osteopetrosis with neural involvement. *J Bone Miner Res.* 21:1098-1105.
- 145 Van Wesenbeeck, L., P.R. Odgren, F.P. Coxon, A. Frattini, P. Moens, B. Perdu, C.A. MacKay, E. Van Hul, J.P. Timmermans, F. Vanhoenacker, R. Jacobs, B. Peruzzi, A. Teti, M.H. Helfrich, M.J. Rogers, A. Villa, and W. Van Hul. 2007. Involvement of *PLEKHM1* in osteoclastic vesicular transport and osteopetrosis in incisors absent rats and humans. *J Clin Invest.* 117:919-930.
- 146 Coccia, P.F., W. Krivit, J. Cervenka, C. Clawson, J.H. Kersey, T.H. Kim, M.E. Nesbit, N.K. Ramsay, P.I. Warkentin, S.L. Teitelbaum, A.J. Kahn, and D.M. Brown. 1980. Successful bone-marrow

- transplantation for infantile malignant osteopetrosis. *N Engl J Med.* 302:701-708.
- 147 Ferrara, F., S. Quaglia, I. Caputo, C. Esposito, M. Lepretti, S. Pastore, R. Giorgi, S. Martelossi, G. Dal Molin, N. Di Toro, A. Ventura, and T. Not. 2010. Anti-transglutaminase antibodies in non-coeliac children suffering from infectious diseases. In *Clin Exp Immunol.* Vol. 159, England. 217-223.
- 148 Driessen, G.J., E.J. Gerritsen, A. Fischer, A. Fath, W.C. Hop, P. Veys, F. Porta, A. Cant, C.G. Steward, J.M. Vossen, D. Uckan, and W. Friedrich. 2003. Long-term outcome of haematopoietic stem cell transplantation in autosomal recessive osteopetrosis: an EBMT report. In *Bone Marrow Transplant.* Vol. 32, England. 657-663
- 149 Schulz, A.S., C.F. Classen, W.A. Mihatsch, M. Sigl-Kraetzig, M. Wiesneth, K.M. Debatin, W. Friedrich, and S.M. Muller. 2002. HLA-haploidentical blood progenitor cell transplantation in osteopetrosis. *Blood.* 99:3458-3460.
- 150 Stewart, B.L., B. Storer, J. Storek, H.J. Deeg, R. Storb, J.A. Hansen, F.R. Appelbaum, P.A. Carpenter, J.E. Sanders, H.P. Kiem, R.A. Nash, E.W. Petersdorf, C. Moravec, A.J. Morton, C. Anasetti, M.E. Flowers, and P.J. Martin. 2004. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. In *Blood.* Vol. 104, United States. 3501-3506.
- 151 Frattini, A., H.C. Blair, M.G. Sacco, F. Cerisoli, F. Faggioli, E.M. Catò, A. Pangrazio, A. Musio, F. Rucci, C. Sobacchi, A.C. Sharrow, S.E. Kalla, M.G. Bruzzone, R. Colombo, M.C. Magli, P. Vezzoni, A. Villa. 2005. Rescue of ATPa3-deficient murine malignant osteopetrosis by hematopoietic stem cell transplantation in utero. In *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 102, United States. 14629-14634.
- 152 Flake, A.W., and E.D. Zanjani. 1999. In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers. *Blood.* 94:2179-2191.
- 153 Tondelli, B., H.C. Blair, M. Guerrini, K.D. Patrene, B. Cassani, P. Vezzoni, and F. Lucchini. 2009. Fetal liver cells transplanted in utero rescue the osteopetrotic phenotype in the oc/oc mouse. In *Am J Pathol.* Vol. 174, United States. 727-735.
- 154 Wengler, G.S., A. Lanfranchi, T. Frusca, R. Verardi, A. Neva, D. Brugnoli, S. Giliani, M. Fiorini, P. Mella, F. Guandalini, E. Mazzolari, S. Pecorelli, L.D. Notarangelo, F. Porta, A.G. Ugazio. 1996. In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDX1). In *Lancet.* Vol. 348. 1484-1487.
- 155 Pirovano S., L.D. Notarangelo, F. Malacarne, E. Mazzolari, F. Porta, A. Lanfranchi, S. Giliani, S. Zucca, S. Pecorelli, A. Albertini, A.G. Ugazio, L. Imberti. 2004. Reconstitution of T-cell compartment

- after in utero stem cell transplantation: analysis of T-cell repertoire and thymic output. In *Haematologica*. Vol. 89. 450-461.
- 156 Scimeca, J.C., A. Franchi, C. Trojani, H. Parrinello, J. Grosgeorge, C. Robert, O. Jaillon, C. Poirier, P. Gaudray, and G.F. Carle. 2000. The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. In *Bone*. Vol. 26, United States. 207-213.
- 157 Blin-Wakkach, C., A. Wakkach, P.M. Sexton, N. Rochet, and G.F. Carle. 2004. Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. In *Leukemia*. Vol. 18, England. 1505-1511.