

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTA' DI FARMACIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE E BIOMOLECOLARI
E CENTRO DI RICERCA SULLE CELLULE STAMINALI

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Farmacotossicologiche,
Farmacognostiche e Biotecnologie Farmacologiche, ciclo XXV

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Generazione di neuroni striatali funzionali da cellule staminali embrionali umane

Settore Disciplinare BIO14

Alessia Delli Carri

Tutor:

Prof.ssa Elena Cattaneo

Coordinatore del dottorato

Prof. Guido Franceschini

Anno accademico 2011-2012

Indice

Obiettivi del lavoro di Dottorato e risultati

Introduzione

1. Formazione dello striato nell'embrione: segnali e molecole coinvolte nello sviluppo
 - 1.1.1. La formazione del tubo neurale è alla base dello sviluppo del sistema nervoso
 - 1.1.2. Vie del segnale coinvolte nella regionalizzazione del sistema nervoso
 - 1.1.3. Regionalizzazione rostro-caudale del prosencefalo e del diencefalo
 - 1.1.4. Regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale
 - 1.2 I gangli della base e il corpo striato: dal telencefalo allo striato
 - 1.2.1 Descrizione anatomica dei gangli della base e del corpo striato
2. Le cellule staminali embrionali umane ricapitolano, *in vitro*, il neurosviluppo umano
 - 2.1.1 Cellule staminali embrionali umane, caratteristiche di pluripotenza *in vitro*
 - 2.1.2 Metodi di induzione neurale delle cellule hES
 - 2.1.3 Protocolli per il differenziamento striatale delle cellule hES
3. Generazione di modelli di studio di malattie, *in vitro*, basati su cellule pluripotenti
 - 3.1 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)
 - 3.2 La tecnica di derivazione delle cellule iPS
 - 3.3 Modelli malattia basati su cellule iPS

Materiali e Metodi

Risultati

1. Messa a punto di un protocollo per il differenziamento diretto, *in vitro*, di cellule staminali pluripotenti verso neuroni con caratteristiche di MSNs
 - 1.1. Cellule staminali pluripotenti, esposte a segnali estrinseci appropriati, acquisiscono un destino telencefalico ventrale
 - 1.2. Il differenziamento a breve termine dei progenitori telencefalici-ventrali generati, porta all'ottenimento di neuroni GABAergici con identità di MSNs
 - 1.3. I MSNs generati acquisiscono una maturazione completa dopo 80 giorni di differenziamento
 - 1.4. La popolazione neuronale generata presenta correnti sodio, potenziali d'azione e recettori GABA funzionali

- 1.5. Precursori striatali derivati da cellule pluripotenti, trapiantati in modelli animali, sopravvivono e differenziano verso neuroni DARPP-32⁺
2. Generazione di un modello malattia, attraverso la generazione di cellule iPS da pazienti affetti da HD
 - 2.1 Generazione di cellule iPS da fibroblasti derivati da pazienti HD
 - 2.2 La lunghezza della ripetizione del tratto CAG non interferisce con il processo di riprogrammazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule iPS
 - 2.3 Il differenziamento neurale di cellule HD-iPS è variabile, ma non influenzato dalla lunghezza del tratto CAG
 - 2.4 Validazione di fenotipi associati alla malattia, in cellule HD-iPS

Discussione

Bibliografia

Obiettivi del lavoro di Dottorato e risultati

L'enfasi sulle cellule staminali ha prodotto aspettative che superano di gran lunga e, probabilmente, non fanno apprezzare i passi in avanti di una ricerca che è ancora di frontiera. Alle numerose proposte di trattamento a base di staminali fanno eco le scarse, se non assenti, evidenze sperimentali e precliniche e la necessità di studi volti a comprendere le tipologie di staminali da utilizzare (laddove adulte), il meccanismo d'azione atteso e il loro effetto a lungo termine. L'avvento della tecnologia della riprogrammazione ha ulteriormente alimentato queste aspettative, nell'ipotesi (ancora fantasiosa) di poter utilizzare le proprie cellule riprogrammate per trattare le varie patologie degenerative umane. Oggi, le cellule staminali vere e riprogrammate sono un affascinante campo di studio di come si formano i nostri tessuti e come si ammalano.

Questa Tesi di Dottorato circoscrive il proprio ambito operativo nel tentativo di ottenere i neuroni che degenerano nella Malattia di Huntington (HD), partendo da cellule staminali. Nonostante nell'ultima fase del lavoro svolto le cellule ottenute siano state utilizzate per esperimenti di trapianto nell'animale, l'enfasi del lavoro era volto primariamente a generare neuroni striatali autentici e quindi rilevanti dal punto di vista patofisiologico. Il loro eventuale effetto curativo sarà oggetto di successive analisi. Analogamente, il secondo obiettivo del lavoro di Tesi, cioè la generazione di cellule iPS da pazienti HD, mirava all'ottenimento di una fonte paziente-specifica di quei neuroni.

La conclusione principale di questo lavoro è l'evidenza di come sia possibile ottenere neuroni striatali autentici da cellule staminali embrionali umane e da cellule iPS. La qualità dei neuroni ottenuti non ha precedenti nella letteratura. Analogamente, durante il lavoro di Dottorato sono state ottenute e caratterizzate cellule iPS da pazienti HD, che potranno essere ulteriormente studiate per la loro capacità di differenziamento e funzionalità seguendo il protocollo messo a punto nella prima parte del progetto di Tesi.

Introduzione

Negli ultimi anni si sono sviluppati diversi filoni di ricerca riguardanti la generazione di diversi sottotipi neurali a partire da cellule staminali embrionali umane. I diversi tipi cellulari ottenuti trovano applicazione nella generazione *in vitro* di modelli malattia per lo studio di diverse patologie: ad esempio oligodendrociti per la sclerosi multipla, neuroni dopaminergici per la Malattia di Parkinson, neuroni striatali per la Malattia di Huntington. Questo approccio di studio rappresenta anche il punto di partenza per il possibile uso di neuroni generati *in vitro*, nel campo della medicina rigenerativa.

L'obiettivo di questa tesi è quello di generare neuroni specializzati di tipo striatale a partire da cellule pluripotenti, e di caratterizzarli tramite una continua comparazione con lo sviluppo dello striato umano. A questo scopo è stato necessario considerare il processo differenziativo e di sviluppo dello striato umano. Nei capitoli successivi verranno quindi considerati questi aspetti, oltre che le vie di segnale coinvolte nel processo, le caratteristiche anatomiche e funzionali dello striato. Successivamente verranno discussi i protocolli recentemente sviluppati per l'ottenimento di neuroni striatali da cellule staminali embrionali, di cui verranno analizzate le caratteristiche e le eventuali applicazioni in modelli *in vivo*. Inoltre, come possibile applicazione del protocollo di differenziamento messo a punto, verrà analizzata la possibilità di generare un modello malattia *in vitro* sfruttando la recente tecnologia della riprogrammazione somatica.

1. Formazione dello striato nell'embrione: segnali e molecole coinvolte nello sviluppo

1.1.1 La formazione del tubo neurale è alla base dello sviluppo del sistema nervoso

Durante lo sviluppo embrionale, in seguito alla fase di gastrulazione si ha la formazione di tre foglietti germinativi: endoderma, mesoderma ed ectoderma; quest'ultimo, in seguito a eventi di induzione, è in grado di generare tessuto neurale che darà origine sia al sistema nervoso centrale, che a quello periferico.

L'ectoderma, grazie ad un processo chiamato neurulazione, genera due strutture: la placca neurale e successivamente il tubo neurale. La placca neurale si forma a partire dalla porzione dorsale dell'ectoderma, definito ectoderma neurale, in seguito ai segnali ricevuti da parte del mesoderma dorsale sottostante; il tubo neurale si forma invece in seguito all'ispessimento dei bordi della placca neurale, i quali si muovono verso l'alto per formare le pliche neurali, mentre appare un solco a forma di U al centro della placca: le pieghe migrano verso la linea mediana dell'embrione, fino a

fondersi e formare il tubo neurale (Fig. 1.1).

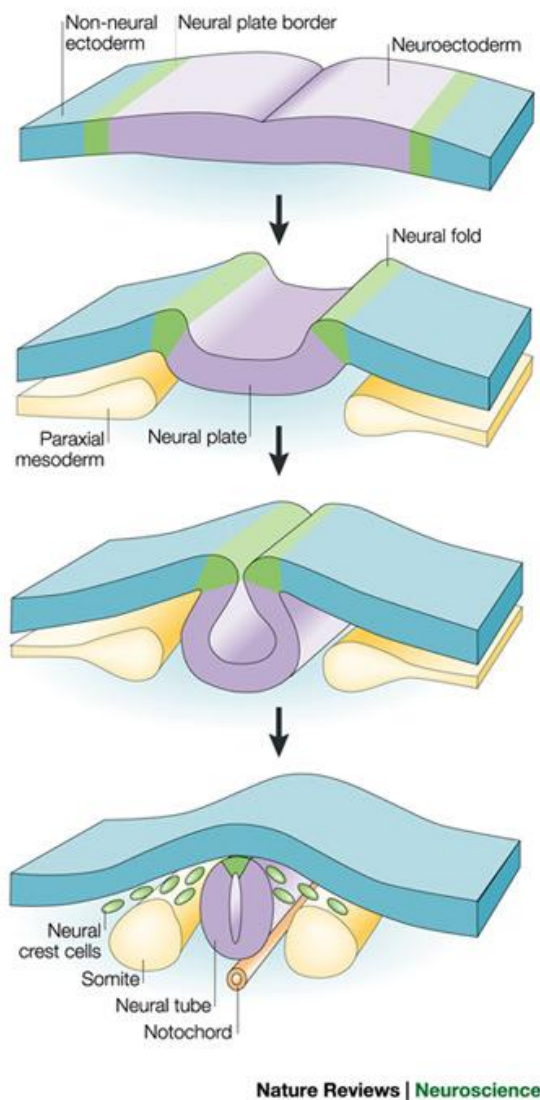


Fig. 1.1. Rappresentazione schematica dello sviluppo del tubo neurale e della formazione delle cellule della cresta neurale, tratto da Gammill LS, 2003

Quest'ultimo si sviluppa poi, in senso caudale-rostrale, in midollo spinale, alle tre vescicole primarie, il romboencefalo, il mesencefalo e il prosencefalo (Fig. 1.2), il quale a sua volta formerà telencefalo e diencefalo (da *“Development of the Nervous System”*, 2005) (Fig. 1.2). Questo sviluppo sequenziale è essenziale per la regionalizzazione antero-posteriore e dorso-ventrale del tubo neurale in formazione, il quale è poi nuovamente modificato dall'organizzatore secondario. Quest'ultimo normalmente si forma nelle zone di confine che separano due compartimenti cerebrali diversi e ha la funzione di regolare e guidare il differenziamento regionale dei tessuti adiacenti (Echevarria et al., 2003). In questa fase dello sviluppo, hanno un ruolo fondamentale le diverse vie

del segnale e i morfogeni secreti dagli organizzatori, in quanto determinano l'identità posizionale dei diversi tipi cellulari, specificando il loro destino neuronale.

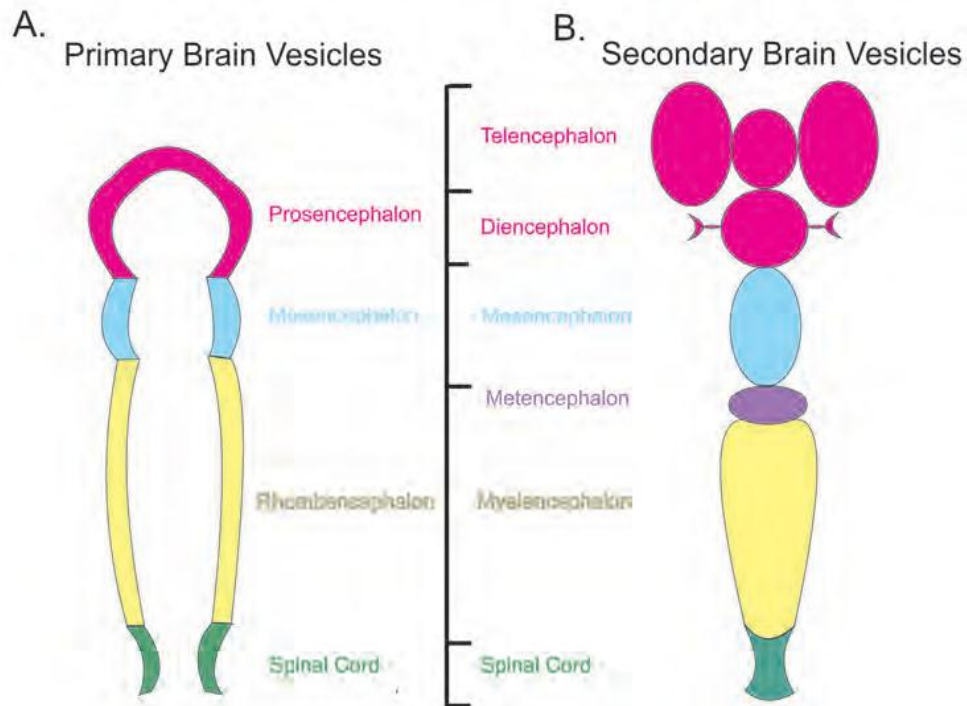


Fig. 1.2. Formazione delle tre vescicole encefaliche primarie e del midollo spinale (A) ed evoluzione allo stadio di 5 vescicole (B)

1.1.2 Vie del segnale coinvolte nella regionalizzazione del sistema nervoso

Di seguito verranno riassunte le principale vie del segnale coinvolte nella regionalizzazione del sistema nervoso.

L'acido retinoico è un morfogeno derivato dalla vitamina A, con effetti sulla formazione delle regioni anteroposteriori; in seguito ad attivazione recettoriale, la sua attività si esplica attraverso l'interazione del complesso ligando-recettore con il *retinoic acid response element* (RARE, sequenza del promotore del gene target) (Fig. 1.3) (Maden, 2002).

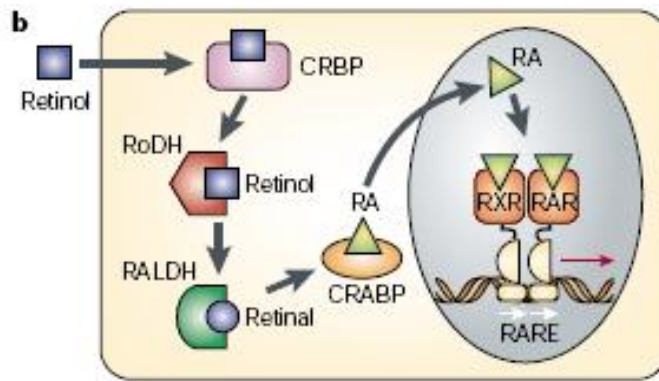


Fig. 1.3. Rappresentazione schematica del *pathway* dell'acido retinoico, tratto da Niederreither and Dolle, 2008

Nell'embrione di pollo allo stadio 4, la fonte di acido retinoico si trova a livello del mesoderma, che giace adiacente al tubo neurale, nel quale sono presenti gli enzimi per la sintesi. Durante l'embriogenesi diffonde nel romboencefalo e nel midollo spinale e successivamente attraverso il tubo neurale, dove va ad attivare i geni Hox. Si forma un gradiente di acido retinoico la cui concentrazione, ad esempio nello *Xenopus*, è 10 volte maggiore nella regione posteriore: esponendo l'embrione a concentrazioni crescenti di acido retinoico si osserva una riduzione nello sviluppo della zona anteriore cefalica e un'inibizione dell'espressione di geni Hox a livello anteriore, comportando un'azione di posteriorizzazione (da "*Development of the Nervous System*", 2005).

Le proteine Wnt sono glicoproteine secrete caratterizzate da numerosi residui cisteinici conservati, le cui funzioni sono state indagate attraverso studi genetici su diversi modelli animali, primi tra tutti la *Drosophila melanogaster*. Le proteine Wnt agiscono come molecole segnale in grado di attivare almeno tre vie intracellulari: *Wnt/β-Catenina*, *Wnt/PCP* e *Wnt/calcio*.

La via più studiata è *Wnt/β-Catenina*, chiamata anche "via canonica" coinvolta nella regolazione della proliferazione e sopravvivenza cellulare. La via "*Planar Cell Polarity (PCP)- like*" è coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro e delle polarità e migrazione cellulare; la funzione della via "calcio-mediata" invece non è stata ben chiarita.

La via canonica risulta essere coinvolta durante il neurosviluppo in diversi processi quali la proliferazione e il differenziamento dei progenitori al livello della corteccia, nella regolazione della maturazione assonale del cervelletto e nello sviluppo della plasticità sinaptica nei neuroni ippocampali.

Una volta secrete nell'ambiente extracellulare, le glicoproteine Wnt interagiscono con il recettore *Frizzled (FZD)* e il corecettore *LDL-Receptor-related Protein 5-6 (LRP5 e LRP6)*, portando all'attivazione intracellulare della proteina *Dishevelled* la quale blocca la degradazione del complesso $\beta\text{-Catenina} + \text{Axin} + \text{GSK-3}\beta + \text{APC}$. Accumulandosi a livello citoplasmatico, il complesso

entra nel nucleo e rilascia β -Catenina la quale, legandosi a TCF, porta all'attivazione dei geni *target* (Fig. 1.4) (Logan and Nusse, 2004). In assenza del ligando WNT, invece, la β -Catenina non complessata viene degradata.

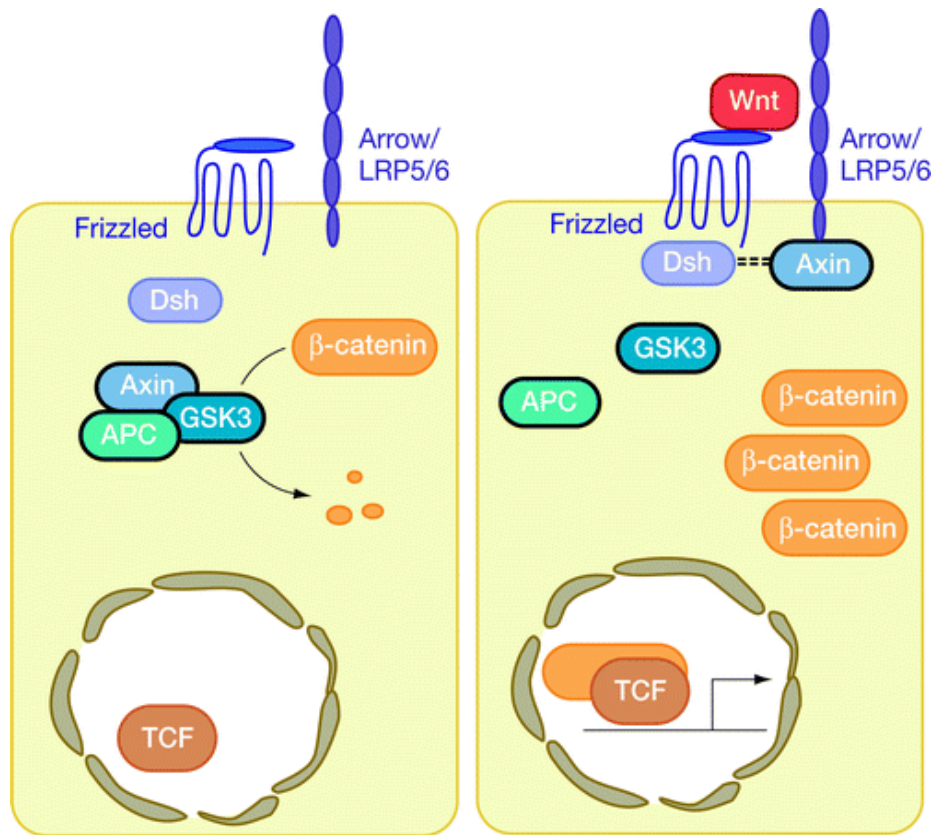


Fig. 1.4. Rappresentazione schematica della 'via canonica' del *pathway* di *Wnt/beta-catenina*, tratto da Logan and Nusse, 2004

Considerando il ruolo svolto nel *patterning* antero-posteriore, le principali glicoproteine della famiglia di Wnt sono Wnt3 e Wnt8, espresse posteriormente allo stadio precoce di gastrula. Esistono tuttavia proteine in grado di inibire il *pathway* di Wnt, quali sFRPs (*secreted frizzled related*) e Dkk (*dickkopf*), le quali sono espresse a livello anteriore. Dkk1/2/4 sono inizialmente espressi durante l'invaginazione del mesoderma, restringendosi poi a livello del blastoporo durante lo stadio di gastrula, durante il quale Dkk-3 è espresso a livello dorso-anteriore; sFRP2-like è anch'esso espresso nel mesoderma durante lo stadio di gastrula, la cui espressione è però limitata alla zona anteriore del mesoderma.

La diversa espressione di agonisti del *pathway* di Wnt posteriormente e quella degli antagonisti anteriormente, suggerisce che il *pathway* di Wnt sia coinvolto nella polarizzazione dell'asse posteriore a livello embrionale (da "*Development of the Nervous System*", 2005).

Il *pathway* di TGF- β (*Transforming growth factor- β*) è coinvolto in diversi processi cellulari, sia

nell'organismo adulto che nell'embrione; la superfamiglia dei ligandi di TGF β comprende *Bone morphogenetic protein* (BMP), un gruppo di proteine quali fattori di crescita e citochine, originariamente scoperta per il loro ruolo nella formazione di ossa e cartilagine. Il *pathway* di BMP prima della gastrulazione è attivo in tutto l'ectoderma, mentre nel mesoderma dorsale vengono rilasciate molecole inibitrici di BMP quali noggin, follistatin e cordin. I ligandi di BMPR vengono successivamente espressi ad elevati livelli ai margini laterali della placca neurale e a livello dorsale nel tubo neurale; ciò crea un gradiente che induce l'espressione di marcatori indicativi della cresta neurale e di precursori neuronali dorsali. La sua azione è mediata dall'attivazione di due tipi di recettore, *BMP receptor I* e *BMP receptor II*, quest'ultimo comprende anche *Activin receptor IIB* (Fig. 1.5).

Subito dopo la chiusura del tubo neurale, la precoce attivazione di BMP è in grado di indurre la formazione del *roof plate*, mentre l'equivalente attivazione durante il periodo tardivo della gestazione, induce la formazione di un dominio dorsale, valutabile con l'espressione di *Msx1*, marcatore dorsale. Inoltre BMP è coinvolto nel differenziamento gliale, in seguito alla coattivazione di CREB (*cAMP response element binding protein*) in un complesso con le proteine STAT e SMAD.

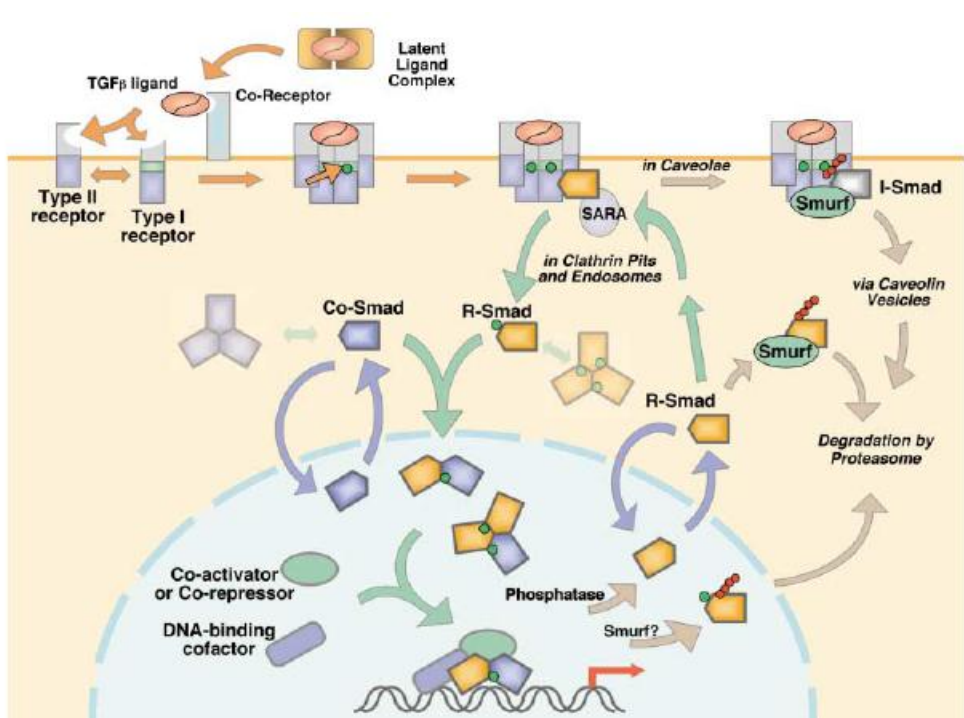


Fig. 1.5. Rappresentazione schematica del *pathway* di TGF- β , tratto da Shi and Massague, 2003

Noggin, follistatin e cordin sono molecole ampiamente studiate per la loro capacità di attivare l'induzione neurale. Nel tempo si è delineata una loro azione indiretta nell'induzione neurale, dovuta essenzialmente al loro ruolo di inibitori del *pathway* di BMP. I primi studi sull'argomento, hanno dimostrato come nella *Drosophila* il gene *Sog*, omologo del gene codificante per cordin,

Fibroblast Growth Factors (FGF) è una famiglia di fattori di crescita coinvolta nell'angiogenesi e nello sviluppo embrionale (Nieto et al., 2001). FGFs sono induttori neuronali il cui *pathway* include a valle l'inibizione delle proteine BMP attraverso la fosforilazione di SMAD (Fig. 1.8). Inoltre FGF8 e FGF4 mantengono le cellule in uno stato indifferenziato attraverso l'inibizione del segnale di Notch, proteina costituita da un singolo dominio transmembrana che funge da recettore per i ligandi *Jagged* e *Delta*. FGF permette inoltre il mantenimento delle cellule destinate a formare il tessuto neurale a livello dell'epiblasto.

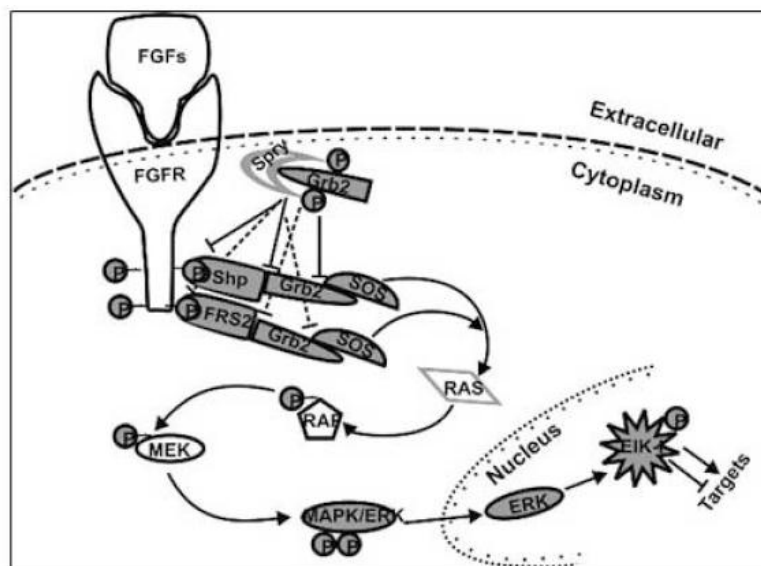


Fig. 1.8. Rappresentazione schematica del *pathway* di FGF, tratto da Oulun University library; 2003

Shh è una proteina necessaria e sufficiente per lo sviluppo di strutture neurali ventrali e l'espressione di marcatori ad esse associati, sia *in vitro* che *in vivo* (Kohtz et al., 1998). Agisce come morfogeno generando un gradiente all'interno del tubo neurale, in cui le cellule rispondono in modo concentrazione-dipendente (Gunhaga L, 2000) (Fig.1.9).

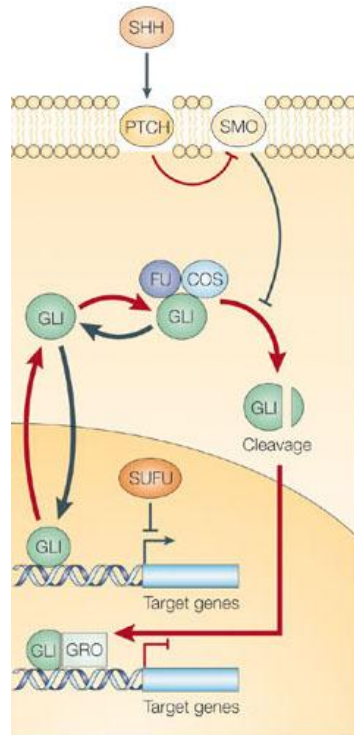


Fig. 1.9. Rappresentazione schematica del *pathway* di Shh tratto da Scotting et al., 2005

E' espresso anche a livello anteriore nel tubo neurale, dove induce ventralizzazione nel prosencefalo. La sua mancanza a stadi successivi dello sviluppo causa oloprosencefalia (da *"Development of the Nervous System"*, 2005).

Le cellule localizzate lungo l'asse rostro-caudale (R-C) e dorso-ventrale (D-V) rispondono quindi a specifici morfogeni, generando specifici sottotipi di neuroni e cellule gliali (Zhang, 2006). Inoltre, l'identità cellulare acquisita dipende anche dal prodotto delle diverse interazioni e delle diverse coregolazioni instaurate tra i diversi morfogeni.

Nasce quindi l'esigenza di indagare l'azione di questi morfogeni, in modo da poter indirizzare *in vitro* le cellule verso il destino d'interesse, che nel nostro caso è di tipo rostro-ventrale essendo i neuroni striatali localizzati anatomicamente a livello dei nuclei della base nel telencefalo ventrale.

1.1.3 Regionalizzazione rostro-caudale del prosencefalo e del diencefalo

La complessa formazione dell'asse RC del sistema nervoso centrale è connessa con gli eventi della gastrulazione e dell'induzione neurale. Gradienti di morfogeni che si vengono a formare allo stadio della placca neurale, guidano le cellule neuroepiteliali nell'acquisizione della loro identità lungo l'asse A-P. La comunicazione molecolare tra i segnali degli Fgfs, Wnt e inibitori di BMP, è essenziale per lo sviluppo delle varie strutture (Vieira et al., 2010). Questi gradienti attivano, nei

progenitori neurali, geni target specifici e inducono competenza locale per rendere le cellule suscettibili all'azione dei diversi morfogeni secreti dagli organizzatori.

L'organizzatore secondario più anteriore, è una fonte di inibitori di Wnt e degli Fgfs, e la loro azione graduale regola il differenziamento delle strutture anteriori (Houart et al., 2002; Nordstrom et al., 2002). La coordinazione dei diversi segnali è basata sull'espressione di fattori di trascrizione che contengono omeodomini, i quali permettono il riconoscimento e il controllo dell'espressione dei geni target. Nel prosencefalo, la famiglia di fattori *Sine-oculis homeobox* (Six) è attivata nella piastra neurale anteriore, nell'area in cui è predominante l'inibizione di Wnt. Six3 reprime la trascrizione dei geni regolati da Wnt e promuove la specificazione cellulare anteriore nelle zone che diventeranno prosencefalo e diencefalo (Lagutin et al., 2003; Lavado et al., 2008). Un altro fattore di trascrizione della famiglia degli omeodomini, *Iroquis homeobox* (Irx), viene espresso in modo complementare a Six3 nelle regioni maggiormente caudali del futuro diencefalo e romboencefalo. Il prosencefalo è diviso trasversalmente in diversi segmenti: il prosencefalo secondario (il quale include il telencefalo e il diencefalo) che successivamente si suddividerà in segmenti chiamati prosomeri. Successivamente la zona intratalamica regola la regionalizzazione del talamo e del pre-talamo secernendo Shh, Fgfs e Wnt.

1.1.4 Regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale

Il tubo neurale, oltre ad essere segmentato lungo l'asse A-P, è polarizzato lungo l'asse dorso-ventrale (D-V) (Fig. 1.10). La regionalizzazione D-V è stata studiata approfonditamente nel midollo spinale, ma anche altre regioni del sistema nervoso centrale (CNS) utilizzano meccanismi simili. La molecola più importante nella determinazione dell'orientamento D-V è SHH, il quale viene secreto dalla notocorda. SHH induce la formazione della *floor plate*, un altro centro del segnale, nella regione ventrale del tubo neurale, che successivamente continuerà a secernere Shh. In modo simile, le proteine BMPs, secrete dall'ectoderma dorsale inducono la formazione di un centro organizzatore secondario.

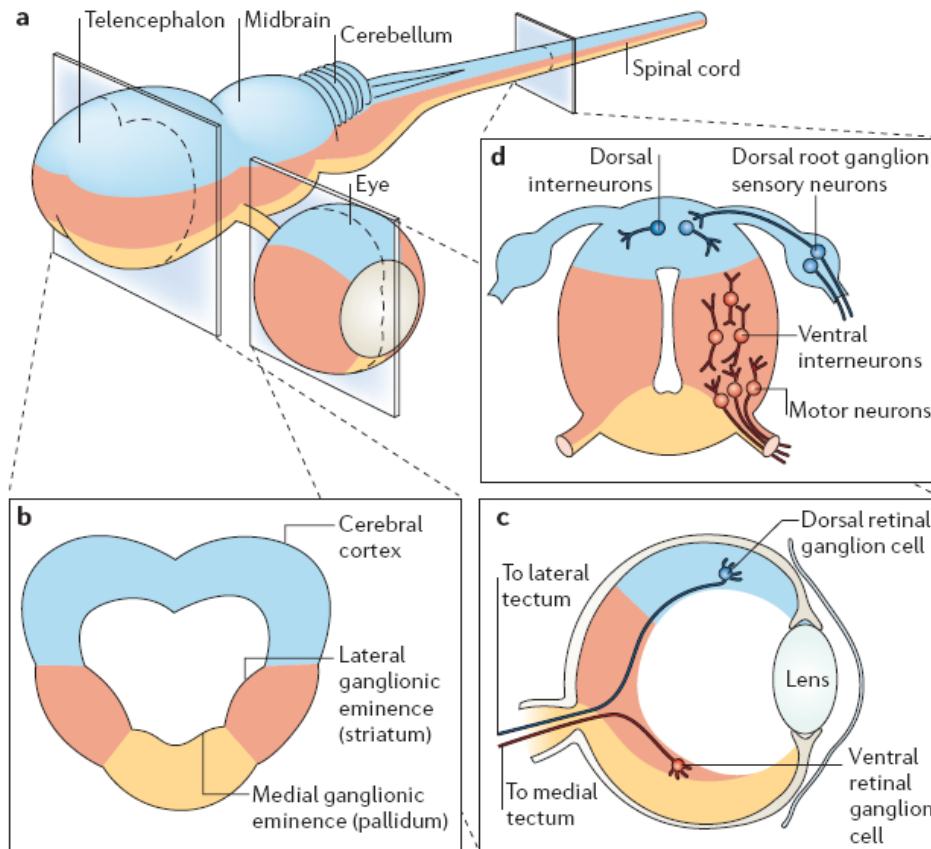


Fig. 1.10. Schematizzazione della regionalizzazione dorso-ventrale del sistema nervoso, tratto da Lupo et al., 2006

L'antagonismo che si viene a creare tra i due gradienti contrapposti, quello di SHH dalla *floor plate* e quello delle proteine BMPs dalla *roof plate*, induce la formazione dei diversi domini generando l'asse dorso-ventrale del tubo neurale. Studi, *in vitro* e *in vivo*, hanno evidenziato la complessa interazione dei differenti fattori di trascrizione nella regionalizzazione ventrale del tubo neurale. I fattori di trascrizione NKX2.1 (Classe 2, attivato da Shh) e Pax6 (Classe I, inibito da Shh) iniziano ad essere espressi in domini adiacenti del tubo neurale, rispettivamente ventralmente e dorsalmente. La loro espressione è finemente regolata dal segnale di Shh e ulteriormente rifinita dalle cross-interazioni tra i fattori di trascrizione di Classe I e II. Meccanismi simili regolano la regionalizzazione del telencefalo, il quale successivamente si suddivide in telencefalo dorsale (pallio), specificato dall'espressione di Pax6, e telencefalo ventrale (subpallio), specificato dalla presenza di Nkx2.1. Il telencefalo ventrale, a sua volta, si suddividerà nelle eminenze ganglionari, nel setto e nella regioni telencefaliche ventrali dei peduncoli cerebrali. Le eminenze ganglionari si suddividono in tre tipi: *lateral ganglionic eminence* (LGE) localizzata a livello rostro-dorsale nel *subpallium*, *medial ganglionic eminence* (MGE) localizzata a livello rostro-ventrale, e *caudal ganglionic eminence* (CGE) localizzata a livello caudale. LGE e MGE generano i due principali

nuclei a livello dei gangli della base presenti nel telencefalo, lo striato e il globo pallido rispettivamente, i quali giocano un ruolo centrale nel controllo motorio e nella coordinazione del sistema extrapiramidale. Inoltre, una popolazione di neuroni da MGE e CGE migra dorsalmente dando luogo a interneuroni corticali (Anderson et al., 1997; Deacon et al., 1994; Lavdas et al., 1999; Olsson et al., 1995; Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 2001).

Sin dallo stadio di gastrula, durante lo sviluppo embrionale, Shh è espresso nel mesoendoderma rostrale, determinando la porzione del telencefalo e successivamente l'ipotalamo dorsale e lo stesso telencefalo ventrale. L'over-espressione nel telencefalo embrionale di Shh o la forma attiva-dominante del suo recettore, hanno evidenziato come il segnale di HH specifici sia l'MGE che l'LGE.

1.2 I gangli della base e il corpo striato: dal telencefalo allo striato

Lo striato, derivante dalla LGE, è la principale stazione di afferenza del sistema dei gangli della base, i quali intervengono nel controllo dei movimenti volontari. Al contrario degli altri componenti del sistema motorio, essi non hanno una connessione *input-output* diretta con il tronco encefalico, ma ricevono i maggiori messaggi d'entrata dalla corteccia cerebrale e dal talamo, e mandano efferenze attraverso il talamo alla corteccia motoria, premotoria, prefrontale, e al tronco encefalico. Si ha quindi un'integrazione delle informazioni corticali da parte dei circuiti intrastriatali e della ritrasmissione alla corteccia, tramite il talamo, dei messaggi fondamentali per il controllo motorio. Un particolare interesse per i nuclei della base e per le loro connessioni nasce dal fatto che essi risultano danneggiati in pazienti affetti da malattie neurologiche abbastanza comuni quali malattie extrapiramidali, tra cui la Malattia di Parkinson, la Malattia di Huntington e l'emiballismo (da "*Principles of Neural Science*", 2003).

1.2.1 Descrizione anatomica dei gangli della base e del corpo striato

I gangli della base si trovano nella parte più interna del telencefalo: quest'ultimo è costituito dai due emisferi cerebrali, la cui superficie è ricoperta dalla corteccia, al di sotto della quale troviamo il centro semiovale formato da sostanza bianca, in cui sono immerse masse di sostanza grigia, i gangli della base, denominati anche nuclei della base.

I gangli della base sono costituiti da quattro nuclei principali: lo striato, il globo pallido, *substantia nigra* e il nucleo subtalamico (Fig. 1.11).

Lo **striato** è costituito a sua volta da: nucleo caudato, putamen e striato ventrale (include il *nucleo*

accubens) i quali hanno in comune l'origine embriologica; i primi due, in particolare, rappresentano la parte filogeneticamente più recente del corpo striato (neostriato) e appartengono al telencefalo.

I neuroni striatali proiettano al globo pallido e alla sostanza nera: insieme questi nuclei, i cui corpi cellulari sono morfologicamente simili, formano il maggior punto di uscita dei segnali dai gangli della base.

Il **globo pallido**, la cui derivazione è diencefalica, giace medialmente al putamen ed è suddiviso da una stria di sostanza bianca in una parte esterna e in una parte interna, quest'ultima connessa funzionalmente alla parte reticolare della **sostanza nera**. Le cellule della parte interna del globo pallido e quelle della zona reticolare della sostanza nera utilizzano come neurotrasmettitore l'acido γ -amminobutirrico (GABA) e inviano i propri assoni al talamo e ad alcune formazioni del tronco encefalico.

La **sostanza nera**, oltre alla *pars reticulata*, è costituita da una *pars compacta* i cui neuroni sono di tipo dopaminergico e contengono inoltre neuromelanina, un pigmento nero derivato dall'ossidazione e dalla polimerizzazione della dopamina, il quale negli anni si accumula all'interno di granuli lisosomiali nei corpi cellulari dei neuroni dopaminergici.

Il **nucleo subtalamico**, situato ventralmente al talamo, è connesso anatomicamente con globo pallido e sostanza nera, ed è costituito soprattutto da neuroni glutammatergici (da "Anatomia dell'uomo", 2001).

Tutte le aree della corteccia inviano proiezioni glutammatergiche allo striato, il quale riceve inoltre afferenze eccitatorie da nuclei intralaminari del talamo, proiezioni dopaminergiche dal mesencefalo e input serotoninergici dai nuclei del raphe.

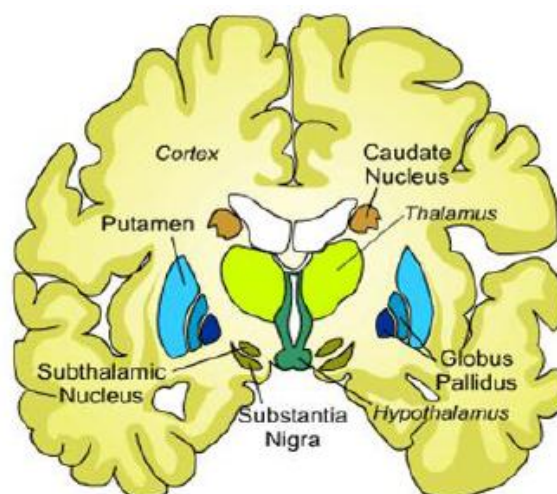


Fig. 1.11 Nuclei della base

Lo striato può essere suddiviso in regioni anatomicamente e funzionalmente differenti; è composto principalmente da due tipi cellulari: *spiny projection neurons* e *aspiny interneurons*. La prima classe rappresenta il 90% delle cellule, conosciute anche come *medium spiny neurons* (MSNs), di tipo GABAergico, caratterizzate da un corpo cellulare di 10-15µm di diametro dal quale dipartono diramazioni dendritiche irradiate. Gli *aspiny interneurons*, invece, possono essere suddivisi anatomicamente in cellule GABAergiche di medie dimensioni e in cellule colinergiche (Kawaguchi et al., 1995).

Come per i MSNs, gli interneuroni striatali ricevono afferenze glutammatergiche dalla corteccia e dal talamo; i segnali in uscita sono principalmente diretti ai MSNs e altri interneuroni. Relativamente alla regionalizzazione, cellule paravalbumina-positivo sono integrate nello striato laterale e risultano meno evidenti nello striato mediale; in contrasto cellule somatostatina-positivo hanno una distribuzione complementare con elevata densità a livello dello striato ventrale e mediale (Kreitzer, 2009).

2. Le cellule staminali embrionali umane ricapitolano, *in vitro*, aspetti del neurosviluppo umano

2.1.1 Cellule staminali embrionali umane, caratteristiche di pluripotenza *in vitro*

Le cellule staminali embrionali (ES) sono cellule pluripotenti il cui stadio di sviluppo è equivalente alla massa cellulare interna (ICM) della blastocisti. *In vivo*, esse sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari derivanti dai tre foglietti germinativi (endoderma, mesoderma ed ectoderma) ad eccezione delle membrane extraembrionali.

Isolate per la prima volta da embrione di topo da Martin Evans (Evans and Kaufman, 1981) e successivamente anche nell'uomo da J. Thomson (Thomson et al., 1998), le cellule ES vengono derivate dalla massa interna della blastocisti, e sono contraddistinte dalla capacità di essere mantenute in coltura allo stadio pluripotente per un numero indefinito di passaggi (Smith, 2001) (Fig. 2.12). Esse possono differenziare verso tutti i tipi cellulari dell'individuo, in seguito al silenziamento di specifici geni coinvolti nel mantenimento della pluripotenza. Un'indagine del 2006 rivela che, dal 1998, sono state derivate 414 linee. Il numero, ad oggi, è senz'altro maggiore e riflette l'obiettivo di raggiungere metodi per l'isolamento e la coltivazione che siano efficienti, efficaci e ideali. La percentuale di successo di derivazione di linee hES dipende, infatti, sia dalle condizioni di coltura che dalla qualità dell'embrione. Si stima che questa percentuale vari tra il 10 e il 20% con punte dichiarate del 45% di efficienza di derivazione per embrione criopreservato.

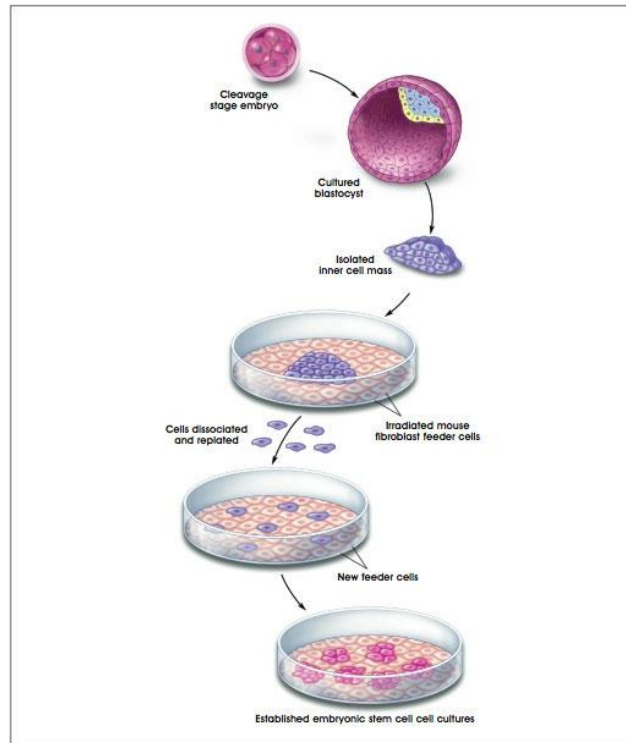


Fig. 2.12. Rappresentazione schematica della derivazione di cellule hES da blastocisti

Le cellule hES, successivamente alla derivazione, vengono mantenute su un tappeto di cellule (*feeder layer*) costituito da *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs), inattivati nella loro capacità proliferativa, i quali garantiscono il supporto di fattori trofici necessari per il mantenimento della pluripotenza. Tuttavia, la crescita delle cellule hES su un *feeder layer* murino rende problematico il loro eventuale impiego clinico ma anche l'applicazione in ricerche di base. Vi è infatti il rischio di trasferimento dal *feeder* alle cellule umane, di virus animali o di proteine sialiche murine altamente immunogeniche (Fig. 2.13).



Fig. 2.13. Morfologia di una colonia di hES cresciuta su *feeder layer*

Si è ritenuto quindi necessario individuare un substrato cellulare più idoneo. La ricerca volta a perfezionare e ottimizzare le tecnologie di crescita (e di differenziamento) delle cellule hES si è rivelata necessaria, è tuttora in corso, ed ha fornito una serie di informazioni trasferibili anche ad

altre tipologie di cellule e ambiti sperimentali.

Alcuni laboratori oggi adottano *feeder* composti da fibroblasti umani ottenuti dalla pelle in epoca postnatale oppure da cellule stromali del midollo osseo umano, resi disponibili a seguito di biopsie effettuate per altri scopi. Altre tipologie cellulari utilizzate comprendono i fibroblasti fetali ottenuti da materiale cadaverico. Sono state utilizzate anche cellule della placenta e dell'epitelio amniotico. Più recentemente il gruppo di Outi Hovatta del Karolinska Institute di Stoccolma ha utilizzato una linea di fibroblasti immortalizzati in grado di produrre FGF, un mitogeno importante per la crescita delle cellule hES. Il vantaggio di una linea immortalizzata risiede nel fatto che la sua funzionalità è, presumibilmente, mantenuta nel tempo mentre i *feeder* tradizionali richiedono preparazione e piastratura *ex novo* (Unger et al., 2009).

Con l'idea di raggiungere condizioni di coltura meno laboriose ed esenti da prodotti animali, sono state ideate alternative all'uso dei *feeder*. I primi tentativi risalgono al 2001 grazie all'impiego di un substrato composto da Matrigel utilizzato in combinazione con un mezzo di coltura raccolto e filtrato dopo incubazione di 12 ore su un *feeder* composto da cellule murine confluenti (Bergstrom et al., 2011). Tuttavia, il Matrigel è composto da un estratto di membrana basale derivato da tumore di topo e contiene una serie di molecole della matrice extracellulare, oltre ad altri fattori ignoti, e l'uso di mezzo condizionato da *feeder* murini ha sempre il problema di non essere adatto ad un eventuale impiego clinico delle cellule. In alternativa al *feeder* animale, sono stati usati mezzi di coltura condizionati da fibroblasti ottenuti dalle stesse cellule hES, mentre il Matrigel è stato sostituito con substrati che usano una singola componente della matrice extracellulare come la laminina o la fibronectina (o vitronectina) di origine animale o umana (Chen et al., 2011). Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi mezzi di coltura maggiormente definiti, e con una percentuale di componenti animali quasi trascurabile. In queste condizioni sperimentali, la contaminazione da componenti animali risulta fortemente ridotta.

Per il mantenimento in coltura delle cellule hES allo stadio pluripotente e indifferenziato, il *medium* deve essere completato con FGF-2 che attiva il pathway di PI3-K, nel quale si ha la fosforilazione di GSK3 β e la traslocazione di β -Catenina dalla regione citoplasmatica al nucleo, la quale aiuta l'attivazione trascrizionale di TCF/LEF e promuove la regolazione di geni *target* di Wnt quali *Octamer Binding Protein 4* (Oct4) e Nanog (Ding et al., 2009) (Fig. 2.14).

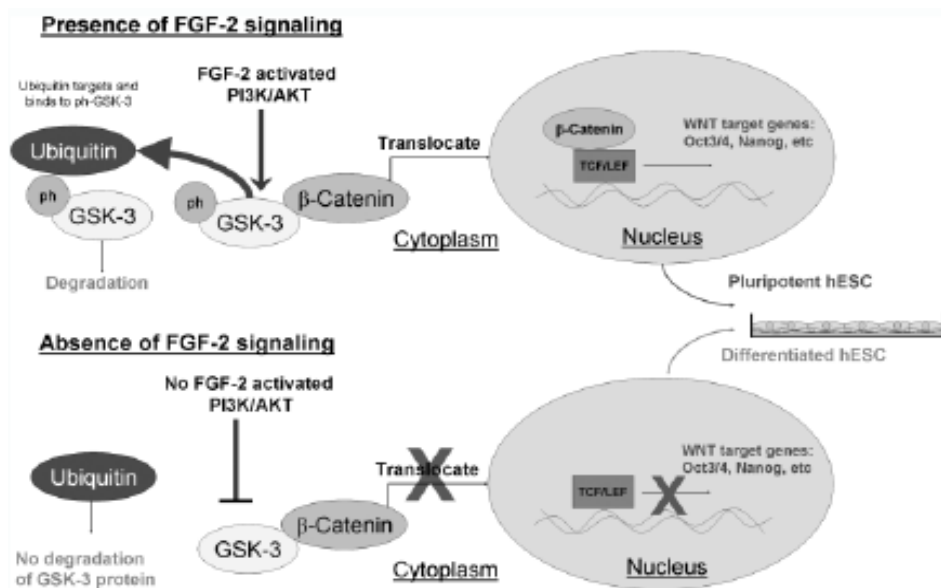


Fig. 2.14 Modello d'azione di FGF-2 esogeno nel mantenimento dello stato indifferenziato nelle hES

Ligandi quali Activina/Nodal/TGFbeta 1 secreti dai *feeder* sono possibili candidati come fattori chiave della crescita di queste cellule. Activina e Nodal inibiscono, infatti, il differenziamento e possono sinergizzare con Fgf e Wnt nel promuovere il rinnovamento cellulare (Vallier et al., 2005). Oct4 è il principale fattore di trascrizione che permette di definire la pluripotenza in una cellula. Sia nell'uomo che nel topo, la sua espressione è limitata alla massa cellulare interna, la cui perdita causa il differenziamento delle ES a trofoblasto (Loh et al., 2006). Esso media la sua azione in seguito al legame con il DNA con il quale eterodimerizza insieme ad altri fattori di trascrizione quali Sox2 (*Sry-related HMG box containing*). Quest'ultimo fattore di trascrizione è espresso insieme ad Oct4 a livello embrionale, del quale è in grado di mediare l'attivazione o la repressione (Botquin et al., 1998).

Nanog è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia delle proteine con dominio homeobox, la cui espressione si osserva a livello della massa cellulare interna e delle cellule germinali primordiali. Esso agisce insieme ad Oct4 nel mantenimento dello stato cellulare indifferenziato, tuttavia mentre Oct4 svolge la sua funzione nel prevenire il differenziamento della massa cellulare interna a trofoectoderma, Nanog previene il differenziamento ad endoderma extraembrionale e mantiene la pluripotenza (Chambers et al., 2003; Mitsui K, 2003). Recenti studi mostrano un suo ruolo nella stabilizzazione dello stato di pluripotenza, piuttosto che nel suo mantenimento. Infatti, sono stati osservati livelli fluttuanti di Nanog in culture di cellule staminali embrionali in cui l'auto-rinnovamento, in assenza di Nanog, continua fino a quando segnali estrinseci non ne promuovono il differenziamento (Chambers et al., 2007).

Oltre ad Oct4, Sox2 e Nanog, i quali controllano in maniera sinergica l'espressione di geni chiave per la pluripotenza ed il differenziamento, vi sono altri geni che identificano lo stadio di ES, quali Fgf4 (Botquin et al., 1998), Rex-1 (Rogers et al., 1991) e GDF-3 (Caricasole et al., 1998).

Tra i marcatori per l'identificazione di hES troviamo anche proteine di superficie di natura glicolipidica come SSEA (*Stage Specific Embryonic Antigens*) 3 e 4 espressi allo stadio di pluripotenza nella blastocisti a livello delle cellule della ICM. Sempre a livello della membrana plasmatica troviamo CD9, proteina di tipo III costituita da quattro domini transmembrana coinvolto nel pathway LIF/STAT3 (Pera et al., 2003) espressa sia nelle hES, che nelle cellule murine ES.

Tra i marcatori associati alla matrice pericellulare troviamo, espressi solo dalle hES, GCTM-2 (*Germ Cell Tumor Monoclonal-2*) e TRA (*Tumor Rejection Antigen*). Quest'ultimo è un epitopo sialidasi-sensibile che si trova in due forme note come TRA-1-60 e TRA-1-81. Infine, anche alcuni enzimi vengono usati come marcatori delle hES, quali la fosfatasi alcalina e la telomerasi (Pera et al., 2003).

Oltre ai marcatori, sono stati definiti alcuni criteri funzionali che permettono di valutare la pluripotenza delle cellule, sia *in vitro* che *in vivo*: le cellule devono infatti poter essere propagate nello stato indifferenziato e differenziare spontaneamente verso i tutti tipi cellulari dei tre foglietti germinativi; una volta trapiantate in topi immunodepressi devono formare teratomi (tumori embrionali caratterizzati dalla presenza di diversi tipi cellulari differenziati); per quanto riguarda le mES, quando iniettate in blastocisti devono originare tutti i tipi cellulari di un individuo adulto (includere le cellule germinali), permettendo di ottenere linee di animali (chimere) che devono essere stabilmente diploidi e cariotipicamente normali *in vitro* (Pera et al., 2003).

Attualmente le cellule staminali embrionali umane trovano applicazione in diversi campi: dalla creazione di modelli cellulari di malattia, utilizzati per la ricerca di base ma anche per l'identificazione di farmaci innovativi, alla creazione di modelli di studio dello sviluppo umano. Inoltre possono essere utilizzate per derivare linee cellulari stabili, in seguito all'applicazione di protocolli di differenziamento, che ne potrebbero permettere l'impiego nella terapia cellulare sostitutiva.

2.1.2 Metodi di induzione neurale delle cellule hES

I protocolli di differenziamento diretto di hES verso neuroni maturi sono composti, nella maggior parte, da tre fasi: (i) induzione neurale, in cui le cellule perdono le loro caratteristiche di pluripotenza, acquisendo quelle di cellule neuroepiteliali; (ii) regionalizzazione, durante la quale i progenitori neurali ottenuti vengono indirizzati verso una precisa identità posizionale e (iii) differenziamento terminale, in cui i progenitori maturano in senso morfologico, antigenico e

funzionale fino a diventare il sottotipo neuronale maturo di interesse.

Per quanto riguarda la prima fase, ad oggi sono stati sviluppati principalmente tre metodi per indurre la conversione di hES verso progenitori neurali: il primo prevede il differenziamento spontaneo delle hES attraverso la formazione di *Embryoid Bodies* (EBs), strutture tridimensionali che ricapitolano, *in vitro*, la formazione dei tre foglietti germinativi che avviene *in vivo* (Zhang et al., 2001). Le cellule hES, private dell'azione dei mitogeni, in questo modo differenziano spontaneamente verso progenitori dei tre *lineages*, tra cui le cellule del neuroectoderma, che *in vitro* si organizzano formando le “rosette neurali”, strutture radiali, con un lume centrale, formatesi in seguito a riarrangiamento di cellule colonnari che ricordano la visione trasversale del tubo neurale (Zhang et al., 2001). Questo metodo risulta essere il più semplice ed il più economico, in quanto la generazione di EBs è facilmente ricavabile da tutte le linee cellulari senza l'aggiunta di ulteriori fattori. Il maggior limite di questa tecnica consiste soprattutto nella stocasticità del differenziamento verso i tre *lineages*, in quanto alcune linee sono più propense rispetto ad altre alla generazione di rosette. Inoltre, una volta avvenuta la formazione di rosette, queste devono essere isolate meccanicamente per eliminare la contaminazione di cellule appartenenti agli altri foglietti germinativi. Ciò introduce variabilità operatore-dipendente nel protocollo, nonché difficile riproducibilità.

Un secondo metodo prevede la co-coltura di cellule hES con cellule stromali quali PA6 o MS5, promuovendo anche in questo caso la formazione di rosette neurali tramite l'azione, per lo più ignota, di fattori secreti dalle cellule stromali (Perrier et al., 2004; Aubry et al., 2008). Il problema maggiore di questa metodologia risiede nell'introduzione di un secondo tipo cellulare, per lo più di origine murina, secernente fattori ignoti. Anche in questo caso vi è scarsa riproducibilità, in quanto l'efficienza dell'induzione neurale dipende soprattutto dalla qualità delle cellule stromali che può variare nelle diverse volte e nei diversi passaggi.

In parallelo è stato messo a punto un terzo metodo in grado di indurre le cellule verso differenziamento neurale in modo definito ed omogeneo, permettendo di ottenere una popolazione cellulare di progenitori neurali tramite l'inibizione del *pathway* di BMP e SMAD (Chambers et al., 2009).

Dalla letteratura è noto che colture di hES, se lasciate differenziare spontaneamente *in vitro*, generano cellule endodermiche secondo un meccanismo di *feedback* positivo in cui BMP2, secreto dalle cellule stesse, è in grado di attivare il *pathway* di Smad1, inducendo questo tipo di differenziamento (Pera et al., 2004). Nel lavoro del gruppo di Pera del 2004, viene valutato l'effetto ottenuto dal trattamento delle cellule hES con diversi antagonisti di BMP quali Noggin, Follistatin e Cerberus. Tuttavia, Noggin non mostra il suo effetto nel prevenire il differenziamento delle cellule

hES, bensì esso è in grado di generare una popolazione cellulare morfologicamente distinta. Questa, malgrado non formi la caratteristica struttura di rosetta neurale come invece accade nel differenziamento spontaneo (strutture osservabili anche nelle neurosfere derivate dal trattamento di colonie di hES con Noggin), esprime marcatori di neuroectoderma quali PAX6 e SOX1. In questo esperimento le condizioni di coltura utilizzate richiedono l'utilizzo di *feeder* di MEF e la presenza di siero, suggerendo quindi che Noggin agisca in sinergia con altri fattori nel mediare il differenziamento neurale (Dottori and Pera, 2008).

Nel 2005 diversi gruppi hanno descritto come il trattamento di cellule hES con Noggin in sistemi diversi, sia in differenziamenti effettuati in condizione di monostrato che in sospensione, induca specificamente la formazione di neuroectoderma, limitando la formazione di cellule di endo o mesoderma (Itsykson et al., 2005; Gerrard et al., 2005).

Alcuni anni dopo, diversi lavori hanno iniziato a descrivere come anche l'inibizione del *pathway* di Activina/Nodal riesca ad indurre specificatamente il *lineage* neuronale. Cellule hES trattate con il composto SB431542, il quale inibisce i recettori chinasi activina-dipendenti (ALK) appartenenti alla famiglia del TGF- β , e più specificamente ALK4, ALK5 e ALK7, perdono rapidamente OCT4 e NANOG inducendo invece specificamente l'espressione di geni del neuroectoderma come SOX1 e Musashi, in assenza di marcatori di altri foglietti (Patani et al., 2009).

Queste evidenze sono state riassunte e ottimizzate nel 2009 dal gruppo del Prof. Studer in un lavoro che descrive come combinando il trattamento di Noggin con SB431542, si ottiene l'inibizione della fosforilazione di activina e recettori di TGF β , bloccando a valle il *signaling* mediato da Smad2/3, incrementando così l'induzione neurale delle cellule hES. Il protocollo prevede che le cellule hES, dopo essere state dissociate a cellule singole, vengano piastrate su matrigel e mantenute in medium di proliferazione con l'aggiunta di FGF2. Raggiunta la confluenza, al medium vengono aggiunti i due inibitori, Noggin e SB431542, mantenuti per 11 giorni, fino a quando si osserva la comparsa di rosette neurali, identificate da PAX6 e SOX1. Nel lavoro si osserva come l'utilizzo in combinazione dei due inibitori porti ad un'induzione neurale dell'80% delle cellule, rispetto al 10% di cellule PAX6 positive osservato se i due inibitori vengono usati singolarmente (Chambers et al., 2009). Le cellule PAX6 positive esprimono inoltre marcatori tipici del CNS anteriore, quali OTX2 e FOXG1 dimostrando che, come presentato nel lavoro del gruppo del Prof. Studer (Elkabetz et al., 2008), le cellule che formano le rosette mostrano un destino anteriore di *default*. Per dimostrare la capacità dei precursori ottenuti di differenziare terminalmente verso neuroni maturi, dopo opportuna regionalizzazione, si è studiata la loro attitudine a diventare neuroni dopaminergici e motoneuroni. Alla fine del differenziamento, infatti, i neuroni ottenuti esprimono marcatori specifici per neuroni dopaminergici, come la tirosina idrossilasi (TH), e di motoneuroni, come HB9 (Chambers et al.,

2009), dimostrando come progenitori neurali del CNS, ottenuti con questo protocollo, siano in grado di differenziare verso fenotipi neuronali diversi tra loro, in presenza di opportuni segnali.

2.1.3 Protocolli per il differenziamento striatale delle cellule hES

Il primo protocollo che descrive la generazione di una popolazione arricchita di MSNs a partire da cellule hES, risale al 2008, pubblicato dal gruppo del dott. Perrier. Il protocollo, la cui fase di induzione neurale prevede la co-coltura con le cellule stromali MS5, consiste di tre diverse fasi: (i) induzione neurale in cui, dopo 3 settimane di co-coltura con MS5, si osserva la formazione di rosette neurali in grado di essere espanse e poi terminalmente differenziate; (ii) regionalizzazione dei precursori neuronali ottenuti verso un'identità telencefalica-striatale e (iii) differenziamento terminale e maturazione dei neuroni striatali (Aubry et al., 2008) (Fig. 2.13).

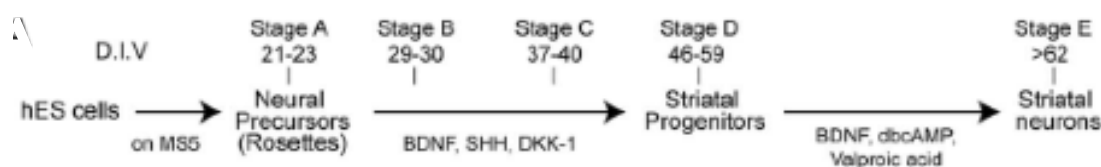


Fig. 2.13 Schema del protocollo di differenziamento, tratto da Aubry et al., 2008

L'analisi dell'espressione genica effettuata nel periodo compreso tra il giorno 0 e il giorno 23 (stadio A), fase in cui appaiono le rosette, mostra una diminuzione tempo-dipendente di Nanog, e un picco d'espressione al giorno 21-23 di SIX3, marcatore precoce di cellule del neuroectoderma anteriore, mentre si osserva un ritardo nell'espressione di SOX1. Nella seconda fase, dopo 4-5 settimane, le rosette vengono esposte a medium addizionato con N2 (supplemento utilizzato in colture di cellule neuronali), neurotrofine come il BDNF, e i morfogeni SHH e DKK-1. Ciò permette la formazione di progenitori neurali positivi a marcatori quali nestin, PAX6, ma anche a BF1 (FOXP1), fattore di trascrizione espresso specificamente nella zona ventricolare e subventricolare del telencefalo in sviluppo (Tao and Lai, 1992) che, pur essendo espresso già allo stadio di formazione di rosette, al giorno 29-30 (stadio B) del differenziamento arriva a *plateau*. L'arricchimento di progenitori striatali si osserva già in questo stadio, osservando un picco nell'espressione di marcatori della LGE, quali GSH2 e di MGE come NKX2.1 e; se tuttavia nella fase di regionalizzazione vengono rimossi SHH e DKK-1, si osserva una riduzione dell'espressione di questi marcatori, dimostrando quindi che la generazione di progenitori striatali a partire dallo stadio di rosette, può essere regolata da segnali estrinseci.

Nella terza fase, il differenziamento terminale viene ottenuto mantenendo le cellule in mezzo di coltura con l'aggiunta di N2, BDNF, acido valproico (VPA) e dibutilil-cAMP (dbcAMP) i quali hanno un ruolo nello stimolare la neurogenesi di neuroni GABAergici nel prosencefalo di ratto (Laeng et al., 2004). Le cellule mostrano espressione di marcatori di differenziamento neuronale terminale quali MAP2ab (aumenta nello stadio D tra 46-59 giorni, per poi raggiungere un picco nella fase E tra 62-72 giorni), e una concomitante diminuzione nell'espressione di SIX3 e SOX1. Inoltre, tra i 62-72 giorni si osserva l'espressione di marcatori tipici di neuroni striatali postmitotici quali calbindina, DARPP-32 (*dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein*) tipico dei neuroni esprimenti recettori dopaminergici, GAD 65-67 (*Glutamic Acid Decarboxylase 65-67*) enzima coinvolto nella sintesi dell'acido γ -aminobutirrico (GABA). Inoltre, dall'analisi di immunocitochimica si evince che rispetto al totale delle cellule i neuroni MAP2ab positivi sono circa il 22%, il 7,2% delle cellule esprime GABA e il 10,2% DARPP-32. Inoltre si osserva la presenza di neuroni TH positivi, ma con una percentuale inferiore al 2%. Successivamente, per dimostrare la maturità funzionale dei neuroni ottenuti, sono stati effettuati studi di elettrofisiologia, che hanno dimostrato la capacità dei neuroni di indurre un singolo potenziale d'azione e attività ritmica in risposta a correnti depolarizzanti. Per testare la capacità di sopravvivenza ed integrazione *in vivo*, sono stati trapiantati progenitori striatali differenziati a diversi stadi, in striato di ratto immunocompetente precedentemente lesionato in seguito all'iniezione di acido chinolinico (modello animale usato per la malattia di Huntington). In seguito a trapianto, in tutti gli stadi analizzati, si osserva un'eccessiva proliferazione neuronale, molto rapida, che provoca sintomi clinici nel giro di 3-5 mesi. Una probabile causa potrebbe essere la presenza tra i progenitori neurali trapiantati di una percentuale di cellule ancora proliferanti perché non ben differenziate. In conclusione, nonostante sia stata dimostrata la capacità di ottenere neuroni DARPP-32 positivi da cellule hES, l'efficienza di generazione è molto bassa e il protocollo genera una popolazione troppo eterogenea per essere utilizzata per trapianti.

Il secondo lavoro in cui si osserva la formazione di neuroni DARPP-32 positivi, è quello pubblicato dal gruppo del Prof. Zhang (Li et al., 2009b) in cui viene dimostrato che, in assenza di morfogeni noti, le cellule hES differenziano di *default* verso progenitori neurali con identità telencefalica-dorsale, attribuita all'attivazione del *pathway* endogeno di Wnt. Tuttavia, l'inibizione di Wnt mediante DKK-1 e l'attivazione del *signalling* di Shh, permette la completa conversione da progenitori telencefalici dorsali a progenitori ventrali. Il protocollo prevede la fase di induzione neurale in sospensione tramite la formazione di EBs poi piastrati su laminina e lasciati differenziare fino al giorno 16, momento in cui si osserva la formazione delle rosette neurali. Per la fase di regionalizzazione dei progenitori neurali, le rosette vengono isolate e le cellule mantenute in

sospensione con l'aggiunta di SHH e DKK-1 fino al giorno 28, dopo il quale vengono dissociate e piastrate su un substrato di poli-ornitina/laminina. Successivamente vengono differenziate terminalmente con l'aggiunta di fattori trofici, quali BDNF e *insulin-like growth factor 1* (IGF1), oltre ad N2 e B27 (supplemento utilizzato in colture di cellule neuronali). Il presente studio dimostra che per ottenere neuroni telencefalici ventrali è necessaria l'attivazione di SHH e l'inibizione delle proteine WNT. E' dimostrato infatti che, utilizzando una concentrazione di SHH di 100 ng/ml, si ha aumento dell'espressione di marcatori ventrali quali NKX2.1 ed una diminuzione del marcatore dorsale PAX6; se invece la concentrazione di utilizzo di SHH viene aumentata a 500 ng/ml si ha un incremento ulteriore nell'espressione di NKX2.1 fino all'84%, accompagnata dall'aumento di BF1, indice che il differenziamento viene indotto verso un destino telencefalico ventrale. Analogo risultato si ottiene se a SHH utilizzato ad una concentrazione di 100 ng/mL viene associato l'uso di DKK-1, si ottiene lo stesso risultato. In quest'ultimo caso l'azione ventralizzante è mediata dall'inibizione da parte di DKK-1 della forma repressiva di GLI3 (punto di convergenza tra Wnt e Shh per la regolazione dell'identità dorso/ventrale), del quale viene invece indotta la forma attiva, di cui è noto il coinvolgimento nel *patterning* ventrale telencefalico del topo (Yu et al., 2009), permettendo così un'efficiente ventralizzazione dei progenitori telencefalici (Li et al., 2009b).

Riguardo alla formazione di neuroni terminalmente differenziati, dopo 6 settimane di differenziamento si osserva l'espressione di β -III tubulina e MAP2ab. Inoltre, si osserva positività per ISLET1, marcatore di precursori e neuroni postmitotici ventrali. Dopo 1 mese di differenziamento in alcune cellule si ha positività per marcatori di neuroni GABAergici di proiezione quali GAD65/67 e DARPP-32. D'altra parte alcune cellule esprimono marcatori di neuroni glutammatergici quali VGLUT1. Entrambi i tipi neuronali analizzati mostrano attività sinaptica, confermando la capacità di queste cellule di formare sinapsi funzionali. Questo lavoro offre quindi una chiara evidenza dell'attività di morfogeni nell'indirizzare cellule hES verso neuroni striatali e corticali, anche se lo stesso gruppo del Prof. Zhang ha nuovamente pubblicato un lavoro riguardante la generazione di neuroni DARPP-32⁺ da cellule hES. Come nel lavoro precedente, il metodo di induzione neurale si basa sulla formazione di EBs, e tramite successive fasi in adesione, sospensione e successiva adesione, le cellule sono regionalizzate verso progenitori telencefalici tramite SHH e poi terminalmente differenziate (Fig. 2.14).

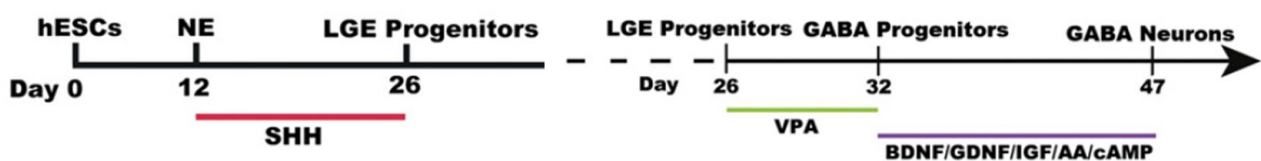


Fig. 2.14. Schema del protocollo di differenziamento, tratto da Ma et al., 2012

I mezzi di coltura utilizzati hanno una composizione simile a quella dei lavori precedenti, permettendo la sopravvivenza e la maturazione neuronale. In questo lavoro, a differenza di quello del 2009, nella fase di regionalizzazione non viene usato DKK-1, inoltre viene nuovamente analizzato il ruolo di SHH, usato a dosi crescenti, nell'induzione di Pax6, Nkx2.1 e Gsx2. L'analisi di Q-PCR evidenzia come 200ng/ml di SHH sia la concentrazione ottimale per la generazione di una popolazione di progenitori striatali MASH1, MEIS2 e Nkx2.1 positivi, con la minima presenza di PAX6, mentre Gsx2 viene valutato tramite mRNA. Dopo differenziamento terminale, al giorno 47, il 90% delle cellule esprime β III-tubulina e il 70% DARPP-32. L'analisi elettrofisiologica rivela la presenza di un potenziale d'azione nel neurone analizzato e correnti sinaptiche.

Grande attenzione è rivolta agli studi *in vivo* in cui vengono trapiantate cellule differenziate per 40 giorni nello striato di topi immunodeficienti precedentemente lesionati con acido chinolinico. Quattro mesi dopo il trapianto, analisi di immunoistochimica su cervelli trapiantati rivelano la presenza di neuroni GABAergici esprimenti DARPP-32. Inoltre, diversi test comportamentali dimostrano un miglioramento nelle funzioni motorie nei topi trapiantati rispetto ai controlli (Ma et al., 2012).

Tuttavia, sebbene vengano dichiarate alte percentuali di efficienza di generazione di neuroni con fenotipo di MSNs, il protocollo è poco definito e la popolazione di progenitori striatali e di neuroni maturi è poco caratterizzata, sia *in vitro* che *in vivo*, in quanto non viene mostrata nessuna co-espressione di marcatori specificamente striatali né una *signature* elettrofisiologica peculiare di MSNs. Pertanto, si rende ancora necessario lo sviluppo di un protocollo per la generazione diretta di neuroni striatali da hES, che sia il più possibile definito, controllabile e ben caratterizzato nelle sue diverse fasi, obiettivo che è stato oggetto di questa tesi.

3. Generazione di modelli *in vitro* di malattie, basati su cellule pluripotenti

Come descritto nel paragrafo precedente, le cellule staminali pluripotenti sono state ampiamente utilizzate per studiare i meccanismi differenziativi. Il passo successivo è stato poi quello di applicare i protocolli e le conoscenze sviluppate allo studio di patologie genetiche per la generazione di modelli malattia *in vitro*. Questo tipo di strumento è stato particolarmente applicato per lo studio di meccanismi patogenetici di patologie difficilmente analizzabili, come ad esempio le malattie neurodegenerative, il cui materiale di partenza è raramente disponibile. Esistono fondamentalmente due tipi di approcci allo studio di malattie tramite cellule staminali, il "diretto" e

“l’inverso”. Nel primo si parte con una fase di mutagenesi delle cellule hES, tipicamente utilizzando loci genici noti per essere correlati alla malattia di interesse. Quindi, si prosegue con l’analisi di fenotipi-malattia nelle cellule hES stesse o nei loro derivati. Un esempio di studio di questo tipo riguarda la malattia di Lesch-Nyhan, in cui il gene malattia è stato mutato nelle hES tramite ricombinazione omologa. La linea cellulare derivata è stata poi comparata alle hES *wild type* e analizzata per difetti metabolici (Urbach et al., 2004). Nell’approccio “inverso” è possibile, invece, studiare l’effetto di mutazioni in geni predefiniti attraverso l’uso della diagnosi pre-impianto (PGD). La PGD permette di identificare prospetticamente embrioni portatori di geni malattia e, da quelli sovrannumerari di derivare hES portatrici della mutazione, come descritto per la malattia di Huntington, la fibrosi cistica e la sindrome dell’X fragile (Eiges et al., 2007; Mateizel et al., 2006; Pickering et al., 2005). Nonostante questo tipo di approccio sia teoricamente possibile, nella pratica queste linee cellulari si rendono difficilmente disponibili, inoltre riservano comunque diverse complicazioni. Nel primo caso queste sono dovute soprattutto alla difficoltà di manipolazione genetica delle hES, all’assenza di informazioni su alcune malattie di mutazioni geniche associate e anche alla scarsità di fenotipi malattia validi. Nel secondo caso, le limitazioni sono dovute soprattutto alla poca disponibilità di embrioni derivati da PGD e alla casistica limitata di malattie identificabili tramite PGD. D’altra parte, la scoperta della riprogrammazione somatica ha aperto un nuovo scenario, in quanto diventa possibile derivare linee di cellule pluripotenti teoricamente da ogni malattia, conservando il corredo genetico della cellula d’origine.

3.1 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)

Nel corso degli anni si sono susseguiti diversi avanzamenti concettuali e tecnici che hanno portato alla nascita e allo sviluppo della riprogrammazione (Fig. 3.15). Ad esempio, gli esperimenti di trasferimento nucleare somatico hanno permesso di approfondire il concetto di plasticità anche nello stato di cellule differenziate, basilare per la riprogrammazione, così come la generazione di linee di cellule staminali embrionali umane. Altri esperimenti, come gli studi sulle proprietà degli oncogeni retrovirali, o sulla riattivazione dei geni del differenziamento negli eterocarionti, nonché l’aumento di conoscenza sul ruolo dei fattori di trascrizione nella costruzione di circuiti regolatori, hanno portato alla scoperta della riprogrammazione descritta dal gruppo del Prof. Yamanaka nel 2006 (Graf, 2011).



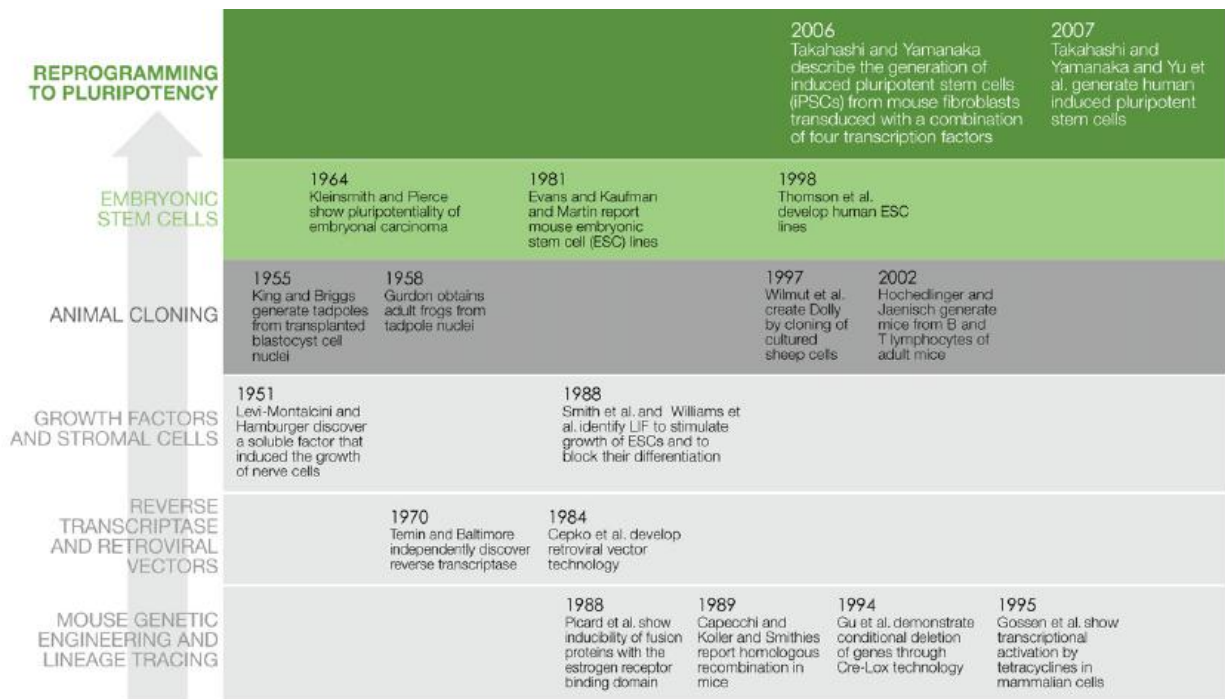


Fig. 3.15. Tappe salienti che hanno portato alla scoperta della riprogrammazione, tratto da Graf, 2011

Brevemente, la tecnica della riprogrammazione consiste nell'espressione forzata di fattori di trascrizione associati alla pluripotenza, in cellule somatiche differenziate. L'espressione forzata induce un cambiamento epigenetico nella cellula, portandola alla riattivazione di geni già silenziati, come appunto quelli responsabili della pluripotenza e del *self-renewal*. Ciò permette la derivazione di una linea cellulare pluripotente partendo da una cellula somatica, in cui viene mantenuto il corredo genetico della cellula d'origine. Per poter identificare i regolatori trascrizionali in grado di riprogrammare cellule adulte differenziate a cellule pluripotenti, il gruppo del Prof. Yamanaka ha effettuato uno *screening* tra 24 fattori associati alla pluripotenza per identificare quelli in grado di de-differenziare una cellula e riportarla allo stadio di staminale pluripotente (Takahashi and Yamanaka, 2006). Come dimostrato nel loro lavoro, l'insieme dei 24 fattori, co-espressi tramite vettori retrovirali, ha portato alla formazione di colonie con una morfologia simile a quelle di cellule ES. Successive fasi di selezione di fattori hanno portato all'individuazione del set minimo di geni richiesto, composto da Klf4, Sox2, C-Myc e Oct4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Le cellule generate, morfologicamente simili alle cellule ES, sono state definite cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), ed esprimono i marcatori tipicamente associati alla pluripotenza, quali Nanog ed SSEA-1, sono in grado di generare teratomi dopo iniezione sub-cutanea in topi immunodeficienti, e contribuiscono alla formazione dei diversi tessuti dell'embrione dopo iniezione in blastocisti. Nonostante queste caratteristiche, la prima generazione di iPS presentava ancora dei difetti, tra cui la bassa espressione di alcuni geni della pluripotenza, in comparazione alle cellule ES, e l'incapacità

di generare chimere o contribuire alla linea germinale (Takahashi and Yamanaka, 2006). Sforzi successivi, svolti nello stesso laboratorio del Prof. Yamanaka, hanno portato all'ottenimento di cellule iPS estremamente simili alle cellule ES, addirittura capaci di generare topi completamente derivati da iPS, tramite iniezione in blastocisti tetraploidi (Boland et al., 2009; Kang et al., 2011; Zhao et al., 2009).

Successivamente alla scoperta pionieristica del 2006, si sono susseguiti diversi lavori sulla generazione di cellule iPS, che hanno dimostrato la loro derivabilità da diverse specie, tra cui uomo (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Park et al., 2008), e scimmia (Liu et al., 2008), dimostrando come le maggiori leggi che regolano la pluripotenza siano rimaste conservate durante l'evoluzione. Inoltre, nel tempo si è dimostrato come fosse possibile utilizzare diversi tipi cellulari come fonte per le cellule iPS, tra cui cheratinociti (Aasen et al., 2008; Maherali and Hochedlinger, 2008), cellule neurali (Eminli et al., 2008; Kim et al., 2009), cellule pancreatiche (Stadtfield et al., 2008) o linfociti (Hanna et al., 2008; Eminli et al., 2009), cellule dello stomaco ed epatiche (Aoi et al., 2008), e melanociti (Utikal J, 2009) (Fig. 3.16).

Species	Germ layer	Cell type	Factors	Efficiency	Reference
<u>Mouse</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.02	Takahashi and Yamanaka 2006
			OXS	0.002	Nakagawa et al. 2008; Wernig et al. 2008b
			OSE	ND	Feng et al. 2009
			KSNr	0.002	Heng et al. 2010
			OKSM + C	3%	Hanna et al. 2008
			OKSM	0.02%	Eminli et al. 2009
			OKSM	25%	Eminli et al. 2009
			OKSM	13%	Eminli et al. 2009
			OKSM	0.2%	Sugii et al. 2010
	EN	Pancreatic β cells Hepatic endoderm	OKSM	0.1%	Stadtfeld et al. 2008a
			OXS	ND	Aoi et al. 2008
	EC	Neural stem cells	OK	<0.1%	JB Kim et al. 2008
			O	<0.01%	JB Kim et al. 2009a
OKM			0.2%	Utikal et al. 2009a	
<u>Human</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.02%	Takahashi et al. 2007
			OSLN	0.02%	Yu et al. 2007
			OXS	0.002	Nakagawa et al. 2008
			OKSM	0.01%	Loh et al. 2009
			OSLN	<0.01%	Haase et al. 2009
			OKSM	ND	Eminli et al. 2009
			OS	<0.01%	Giorgetti et al. 2009
			OKSM	0.5%	Sugii et al. 2010
			OXS	<0.1%	Aoki et al. 2010
	EN	Hepatocytes	OKSM	0.1%	H Liu et al. 2010
	EC	Keratinocytes	OKSM	ND	Aasen et al. 2008
			OXS	ND	Aasen et al. 2008
	EX	Neural stem cells	O	<0.004%	JB Kim et al. 2009b
Amniotic cells			OKSM	0.05%–1.5%	C Li et al. 2009
			OSN	0.1%	Zhao et al. 2010
<u>Rat</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.05% ^a	Liao et al. 2009
			OXS	0.01% ^b	Chang et al. 2010
<u>Rat</u>	EN	Liver progenitor cells	OXS	ND ^c	W Li et al. 2009a
	EC	Neural progenitor cells	OXS	0.01% ^b	Chang et al. 2010
<u>Pig</u>	MS	Embryonic fibroblasts	OKSM	ND	Esteban et al. 2009
<u>Rhesus monkey</u>	MS	Ear skin fibroblasts	OKSM	ND	Liu et al. 2008
<u>Marmoset</u>	MS	Skin fibroblasts	OKSM	0.1%	Wu et al. 2010

Fig. 3.16. Tabella riassuntiva dei diversi tipi cellulari riprogrammati, tratto da Stadtfeld and Hochedlinger, 2011

3.2 La tecnica di derivazione delle cellule iPS

Per poter utilizzare le cellule iPS come uno strumento di studio affidabile *in vitro* ed eventualmente pensare ad una loro possibile applicazione nella medicina traslazionale, è necessario mettere a punto delle tecniche di riprogrammazione sicure ed efficienti. Con questo proposito si è sviluppata negli anni una branca di ricerca completamente dedicata alla messa a punto di nuovi sistemi per la generazione di cellule iPS.

I primi studi sulle cellule iPS prevedevano l'utilizzo di vettori integranti, e in particolare di natura

retrovirale per l'inserzione dei geni di riprogrammazione (Takahashi and Yamanaka, 2006) (Maherali and Hochedlinger, 2008) (Okita et al., 2007) (Wernig M, 2007) (Fig. 3.17).

Vector type	Integrating		
	Retroviral	Lentiviral	Inducible lentiviral
Cell types	Fibroblasts, neural stem cells, liver cells, keratinocytes, amniotic cells, blood cells, adipose cells	Fibroblasts, keratinocytes	Fibroblasts, β cells, keratinocytes, blood cells, melanocytes
Species	m, h, rm, p, r	m, h	m, h, p
Efficiency	~0.01%–0.5%	~0.1%–1% ^a	~0.1%–1% ^a
Pros	Reasonable efficiency	Reasonable efficiency	Reasonable efficiency; controlled factor expression
Cons	Multiple integrations; incomplete silencing	Multiple integrations; incomplete silencing	Multiple integrations; requires transactivator expression

Fig. 3.17. Tabella riassuntiva delle tipologie di vettori integranti usati nella riprogrammazione, tratto da Stadtfeld and Hochedlinger, 2011

Nonostante i transgeni retrovirali siano normalmente silenziati alla fine del processo di riprogrammazione (Stadtfeld and Hochedlinger, 2011), vengono riattivati i geni endogeni e l'istone metiltransferasi, il processo è spesso incompleto, portando alla generazione di linee cellulari parzialmente riprogrammate che dipendono continuamente dall'espressione esogena dei fattori di trascrizione e non in grado di attivare la *machinery* trascrizionale endogena (Takahashi and Yamanaka, 2006; Mikkelsen TS, 2008; Sridharan et al., 2009). Inoltre, l'attività residua o la riattivazione dei transgeni virali in cellule somatiche derivate da cellule iPS può interferire con il loro potenziale di sviluppo e comporta frequentemente la formazione di tumori in animali chimerici (Okita et al., 2007). Questa problematica è stata ulteriormente esacerbata dall'utilizzo di vettori lentivirali, i quali vengono silenziati in modo ancora meno efficiente rispetto ai vettori retrovirali, comportando a volte un blocco nel differenziamento (Brambrink et al., 2008; Sommer et al., 2010) (Fig. 3.17). L'utilizzo di vettori lentivirali inducibili, la cui espressione è controllata dalla somministrazione di doxiciclina, diminuisce il rischio di una continua espressione dei transgeni e permette la selezione di cloni di cellule iPS completamente riprogrammate, in quanto cellule

dipendenti dall'espressione esogena dei fattori smettono rapidamente di proliferare quando viene rimossa la doxiclina (Brambrink et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008).

I vettori lentivirali hanno un'efficienza maggiore rispetto ai vettori retrovirali nell'infettare diversi tipi di cellule somatiche, in quanto non hanno la necessità che le cellule siano attivamente proliferanti. Inoltre, possono essere ingegnerizzati in modo da esprimere cassette policistroniche contenenti i quattro fattori di riprogrammazione, evitando infezioni multiple ed il conseguente problema della diversa espressione dei singoli fattori (Carey et al., 2009; Sommer et al., 2009).

Uno sviluppo successivo ha riguardato la messa a punto di metodiche che prevedessero l'uso di sistemi che evitassero il problema della riattivazione di transgeni e della mutagenesi inserzionale dovuta all'utilizzo di virus. Ciò è particolarmente necessario per un futuro possibile utilizzo di cellule iPS per scopi terapeutici. Le tecniche per generare cellule iPS senza sistemi integranti sono divise in tre categorie: (i) quelle che prevedono vettori che non si integrano nel genoma della cellula ospite, (ii) quelle che usano vettori integranti che possono essere poi successivamente rimossi dal genoma, e (iii) quelle che non comprendono l'utilizzo di vettori basati su DNA (Fig. 3.18).

Vector type	Excisable		Nonintegrating		DNA-free	
	Transposon	Floxed lentiviral	Adenoviral	Plasmid	Protein	RNA
Cell types	Fibroblasts	Fibroblasts	Fibroblasts, liver cells	Fibroblasts	Fibroblasts	Fibroblasts
Species	m, h	m, h	m, h	m, h	m, h	h
Efficiency	~0.1%	~0.1%–1% ^a	~0.001%	~0.001%	~0.001%	~1%
Pros	Reasonable efficiency; no integration	Reasonable efficiency; no integration	No integration	No integration	No integration; no DNA	No integration; high efficiency
Cons	Screening of excised lines laborious	Screening of excised lines laborious, loxP sites remain in genome	Low efficiency	Low efficiency, occasional vector integration	Low efficiency	Multiple rounds of transfection needed

Fig. 3.18. Tabella riassuntiva dei metodi non integranti utilizzati per la riprogrammazione, tratto da Stadtfeld and Hochedlinger, 2011

Le prime cellule iPS generate senza integrazione sono state derivate da epatociti di topo tramite l'uso di vettori adenovirali (Stadtfeld et al., 2008) e da fibroblasti embrionali murini tramite trasfezione con plasmidi (Okita et al., 2008). Questi esperimenti sono stati la prova di principio del

fatto che l'espressione transiente dei quattro fattori classici della riprogrammazione, è sufficiente per indurre la pluripotenza in cellule somatiche. Anche fibroblasti umani sono stati riprogrammati tramite adenovirus (Zhou W, 2009) e Sendai virus (Fusaki et al., 2009), o con vettori circolari episomali non integranti ed eliminabili tramite successive replicazioni (Yu et al., 2007). Quest'ultima metodica comporta però l'espressione contemporanea di sei fattori di trascrizione e un oncogene (Oct4, Sox2, c-Myc, and Klf4, Nanog, Lin28, e SV40LT).

Il problema maggiore associato all'utilizzo di queste metodiche è la ridotta efficienza di riprogrammazione, inferiore di diversi ordini di grandezza a quella raggiunta con l'utilizzo dei vettori integranti (0,001% vs 0,1-1%). Ciò è dovuto soprattutto al non mantenimento dell'espressione dei fattori per un tempo sufficiente per permettere il completo rimodellamento epigenetico necessario. Per risolvere questo problema diversi laboratori hanno sviluppato vettori integranti contenenti i siti LoxP, per permetterne la successiva rimozione dal genoma della cellula ospite, tramite l'espressione della Cre-recombinasi (Kaji et al., 2009; Soldner et al., 2009). Questo metodo ha permesso la generazione di cellule iPS da diversi tipi cellulari, anche se rimane da determinare esattamente se dopo la rimozione rimanga traccia di DNA esogeno.

Un'ulteriore strategia prevede l'impiego dei trasposoni piggyBac, elementi genetici mobili che possono essere introdotti e successivamente rimossi tramite l'espressione transiente della trasposasi (Woltjen et al., 2009; Yusa et al., 2009). La buona funzionalità del sistema ne permette la rimozione, ma rimane necessario poi caratterizzare i siti di integrazione nelle cellule iPS prima e dopo la rimozione.

Un ulteriore sviluppo delle metodiche di riprogrammazione non integranti si è sviluppata verso l'utilizzo di proteine ricombinanti (Zhou W, 2009). Sebbene il sistema sia sicuro e porti alla completa riprogrammazione, l'efficienza di successo è molto bassa e richiede l'aggiunta di ulteriori molecole che siano in grado di facilitare il rimodellamento epigenetico, quali inibitori dell'istone deacetilasi e l'acido valproico.

Un modo più efficiente e sicuro comporta invece l'utilizzo di molecole di RNA modificate, codificanti per i fattori di riprogrammazione (Warren et al., 2010). L'approccio più recente riguarda l'uso di molecole di sintesi in grado di indurre rimodellamenti epigenetici e metabolici, riportando cellule somatiche allo stadio di cellula pluripotenti (Li et al., 2009a). L'efficienza in termini di successo è paragonabile a quella dei vettori virali, ma l'uso di queste molecole deve essere sempre associato all'introduzione dei quattro fattori di riprogrammazione, in quanto da sole non sono in grado di sbloccare la cellula somatica e portarla verso lo stato di instabilità genetica ed epigenetica che precede la riprogrammazione. Inoltre si deve considerare il rischio di modifiche del DNA che potrebbero essere introdotte dall'utilizzo di molecole che agiscono direttamente sul materiale

genetico.

3.3 Modelli malattia basati su cellule iPS

Una prima immediata applicazione della scoperta della riprogrammazione è stata l'utilizzo delle cellule iPS per generare modelli malattia *in vitro* derivati dai pazienti, usati come prova di principio per dimostrare la potenzialità di questo tipo particolare di cellule pluripotenti per sviluppi terapeutici (Juopperi et al., 2011). Dopo la derivazione di cellule iPS paziente-specifiche, queste vengono differenziate verso il tipo cellulare maggiormente colpito nella patologia (Fig. 3.19) e successivamente studiato.

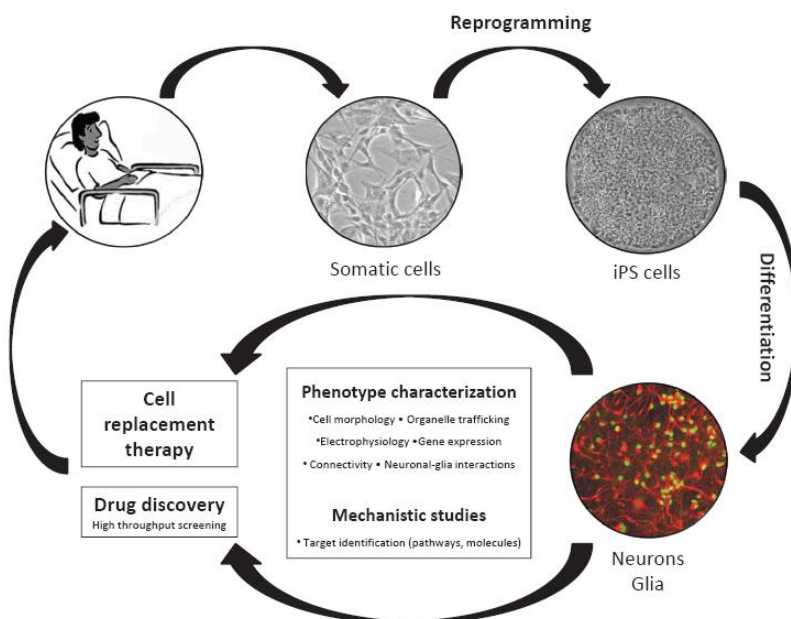


Fig. 3.19. Schema riassuntivo di un possibile approccio per l'utilizzo di cellule iPS per la generazione di modelli malattia *in vitro*, tratto da Saporta et al., 2011

Questo tipo di approccio ha riguardato soprattutto il campo delle malattie neurodegenerative, da sempre di difficile studio, anche per la difficoltà di accesso al materiale patologico.

Le strategie terapeutiche basate sulle cellule staminali possono essere categorizzate in due diverse classi: (i) come piattaforma per la scoperta di nuove molecole bioattive attraverso la dissezione dei processi patogenetici; (ii) come fonte per la sostituzione di cellule danneggiate e ingegneria tissutale, tramite trapianto *in vivo* (Fig. 3.19). Ulteriori vantaggi nell'uso di cellule iPS includono la possibilità di individuare il contributo genetico alla patologia cellulare tramite fonti di cellule paziente-specifiche, la generazione di popolazioni cellulari mirate, e l'opportunità di creare un modello di sviluppo della patologia in un modo controllabile e riproducibile. Un punto chiave di questa strategia è la successiva ricerca, tramite l'uso delle iPS-malattia, di fenotipi specifici ed

associabili alla patologia, i quali possono diventare *target* di molecole in grado di revertire il fenotipo, correggendolo.

Ad oggi sono state generate numerose linee di cellule iPS a partire da diverse fonti cellulari, derivate da pazienti di molteplici malattie neurodegenerative (Fig. 3.19).

Disease	Gene (mutation)	Donor Cell	Reprogramming Method	Reported Disease-Related Phenotype	Reference	Corresponding Author
Parkinson's disease	Idiopathic	Fb	LV: Cre-excisable, DOX-inducible; K,S,O or K,S,O,M		Hargus et al., 2010; Soldner et al., 2009	jaenisch@wi.mit.edu; isacson@hms.harvard.edu
Parkinson's disease	<i>LRRK2</i> (G2019S)	Fb	RV: K,S,O	Increased caspase-3 activation and DA neuron death with various cell stress conditions	Nguyen et al., 2011	tpalmer@stanford.edu; reneer@stanford.edu
Parkinson's disease	<i>PINK1</i> (Q456X; V170G)	Fb	RV: K,S,O,M	Impairment of stress-induced mitochondrial translocation of Parkin in DA neurons	Seibler et al., 2011	dkrainc@partners.org
Huntington's disease	<i>HTT</i> (72 CAG repeats)	Fb	RV: K,S,O,M		Park et al., 2008a	george.daley@childrens.harvard.edu
Amyotrophic lateral sclerosis	<i>SOD1</i> (L144F)	Fb	RV: K,S,O,M		Dimos et al., 2008	eggan@mcb.harvard.edu
Amyotrophic lateral sclerosis	<i>SOD1</i> (L144F; G85S)	Fb	RV: K,S,O		Boulting et al., 2011	eggan@mcb.harvard.edu
Spinal muscular atrophy, type I	<i>SMN1</i> deletion	Fb	LV: S,O,N,L	Reduced number of motor neurons, decreased soma size, and synaptic defects	Ebert et al., 2009	ebert@waisman.wisc.edu; cnsvendens@wisc.edu
Friedreich ataxia	<i>FXN</i> (GAA expansion)	Fb	RV: K,S,O,M		Ku et al., 2010	joelg@scripps.edu
Friedreich ataxia	<i>FXN</i> (GAA expansion)	Fb	RV: K,S,O,M		Liu et al., 2010	apebay@unimelb.edu.au
Familial dysautonomia	<i>IKBKAP</i> (homozygous 2507+6T > C)	Fb	LV: K,S,O,M	Defects in neurogenesis and migration	Lee et al., 2009	studerl@mskcc.org
Duchenne muscular dystrophy	<i>DMD</i> (deletion of exons 45-52)	Fb	RV: K,S,O,M		Park et al., 2008a	george.daley@childrens.harvard.edu
Duchenne muscular dystrophy	<i>DMD</i> (deletion of exons 46-50)	Fb	LV: Cre-excisable, KSOM		Tchieu et al., 2010	kplath@mednet.ucla.edu
Becker muscular dystrophy	Unidentified	Fb	RV: K,S,O,M		Park et al., 2008a	george.daley@childrens.harvard.edu
Rett syndrome	<i>MeCP2</i> (1155 del32; Q244X)	Fb	RV: K,S,O,M	Defects in neuronal morphology, synapses, and electrophysiological function	Marchetto et al., 2010	muotri@ucsd.edu
Rett syndrome	<i>MeCP2</i> (Δ exon 3-4; T158M)	Fb	RV: K,S,O,M	Reduced neuronal soma size (δ exon 3-4 line)	Cheung et al., 2011	jellis@sickkids.ca
Rett syndrome	<i>MeCP2</i> (R306C)	Fb	RV: K,S,O,M		Hotta et al., 2009	jellis@sickkids.ca
Gaucher disease	<i>GBA</i> (AAC > AGC, exon 9, G-insertion, nucleotide 84 of cDNA)	Fb	RV: K,S,O,M		Park et al., 2008a	george.daley@childrens.harvard.edu
Lesch-Nyhan syndrome (carrier)	Heterozygosity of <i>HPRT1</i>	Fb	LV: Dox-inducible, K,S,O,M,N		Park et al., 2008a	george.daley@childrens.harvard.edu
Down syndrome	Trisomy 21	Fb	RV: K,S,O,M		Park et al., 2008a	george.daley@childrens.harvard.edu

Disease	Gene (mutation)	Donor Cell	Reprogramming Method	Reported Disease-Related Phenotype	Reference	Corresponding Author
Fragile-X syndrome	<i>FMR1</i>	Fb	RV: K,S,O,M		Urbach et al., 2010	george.daley@childrens.harvard.edu; nissimb@cc.huji.ac.il
Angelman syndrome	maternally inherited deletions of chr. 15q11-q13	Fb	RV: K,S,O,M,L		Chamberlain et al., 2010	chamberlain@uchc.edu; lalande@uchc.edu
Prader-Willi syndrome	paternal deletion of chr.15q11-q13	Fb	RV: K,S,O,M,L		Chamberlain et al., 2010	chamberlain@uchc.edu; lalande@uchc.edu
Schizophrenia	Unidentified	Fb	LV: Dox-inducible, K,S,O,M, L	Reduced neurites and synaptic connectivity	Brennand et al., 2011	gage@salk.edu
Schizophrenia	<i>DISC1</i> (4 bp deletion at the exon-intron 12 region)	Fb	Episomal, nonintegrating, DNA plasmids, various combination of factors		Chiang et al., 2011	shongju1@jhmi.edu; rmargolis@jhmi.edu; gming1@jhmi.edu

Fibroblast (Fb), KLF4 (K), SOX2 (S), OCT4 (O), c-MYC (M), N:NANOG (N), LIN28 (L), retrovirus (RV), lentivirus (L), dopamine (DA).

Fig. 3.20. Tabella riassuntiva delle linee di cellule iPS generate da pazienti affetti da malattie neurodegenerative, tratto da Han et al., 2011

Molti studi si sono focalizzati su malattie dalla forte componente genetica e con un fenotipo individuabile in un tessuto o addirittura in un solo tipo cellulare specifico, come la Malattia di Huntington (Dimos et al., 2008; Ebert et al., 2009). La situazione è invece più complessa per ciò che riguarda patologie più composite multigeniche/multifattoriali, quali ad esempio l'Alzheimer, il Parkinson o l'infarto cardiaco. In questo caso è necessario riprodurre la tipologia cellulare colpita, ma anche fenotipi che siano strettamente legati a ciò che è già noto della patologia e che magari siano comuni sia nelle forme genetiche che sporadiche (quando presenti).

Un ulteriore parametro che deve essere necessariamente considerato è il fatto che malattie come quelle precedentemente citate hanno un'insorgenza tardiva, per cui potrebbe essere necessario esporre le cellule generate *in vitro* (soprattutto il sottotipo cellulare differenziato dalle cellule iPS) ad agenti stressanti, biologici, chimici o ambientali, in modo da amplificare ed evidenziare possibili fenotipi.

Uno dei primi lavori che hanno descritto la generazione di modelli malattia risale al 2009 in cui Ebert e colleghi hanno generato cellule iPS da fibroblasti di pazienti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA), una malattia neurodegenerativa che colpisce i moto-neuroni, causata dalla diminuzione della proteina SMN. Gli autori hanno riscontrato che, dopo quattro settimane di differenziamento delle cellule iPS verso moto-neuroni, il numero e la grandezza delle cellule controllo o malate era paragonabile. Invece, dopo sei settimane, i moto-neuroni affetti da SMA erano selettivamente ridotti nel numero e nella dimensione, se comparati con le cellule controllo. Ciò suggerisce che i moto-neuroni patologici si sviluppano normalmente ma poi diventano suscettibili alla degenerazione. Gli autori inoltre, hanno osservato una riduzione degli aggregati di

proteina SMN, che normalmente si ritrovano nel citoplasma e nel nucleo e sono inversamente proporzionali alla severità della malattia. Ciò è probabilmente dovuto alla diminuzione della proteina SMN in queste cellule (Ebert et al., 2009). Dopo trattamento dei moto-neuroni con acido valproico o con tobramicina è stato osservato il ripristino di questi aggregati. Sebbene questo studio non dimostri come sia possibile modulare i livelli proteici della proteina SMN e quindi la reversione completa del fenotipo, viene però fornita un'importante prova di principio per l'utilizzo delle cellule iPS nello studio delle malattie umane.

Sempre nel 2009 il gruppo del Prof. Studer (Lee and Studer, 2009) ha descritto la generazione di cellule iPS da tre linee cellulari di fibroblasti derivate da pazienti affetti da Disautonomia Familiare (FD), una neuropatia ereditaria che colpisce il sistema nervoso periferico, dovuta ad una mutazione nel gene *IKBIPAP*, la quale porta ad una minore elongazione trascrizionale di diversi geni target. Nel lavoro vengono dimostrati diversi fenotipi associati alla malattia, tra cui deregolazione di alcuni geni, difetti nel differenziamento neuronale e diminuita migrazione dei precursori della cresta neurale. Comparando i profili di espressione genica dei precursori della cresta neurale derivati da cellule iPS controllo e malattia, è evidente come nelle cellule malattia siano differenzialmente espressi geni coinvolti nella neurogenesi periferica e nel differenziamento neuronale (Lee et al., 2009).

Utilizzando i precursori della cresta neurale derivati da iPS come una piattaforma di *screening* per composti, sono state individuate alcune molecole in grado di revertire parzialmente il fenotipo malattia. Viene dimostrato come il trattamento con chinetina, un ormone derivato dalla piante, riduce fortemente la forma mutata delle *IKBIPAP* incrementando contemporaneamente il numero di neuroni differenziati, sebbene ciò non porti ad un recupero della motilità cellulare. Tramite questo lavoro è stata fornita una prova ulteriore dell'utilità che modelli malattia basati sulle iPS possono fornire, soprattutto nel campo del *drug-screening*.

Materiali e Metodi:

Colture cellulari e differenziamento neuronale. Le linee cellulari hES (H9 e HS401) e le linee di cellule iPS sono state mantenute in coltura come descritto in Camnasio et al., (2012).

Per quanto riguarda l'induzione neurale, le cellule sono state piastrate come descritto in Chambers et al. (2009) alla densità di 0.7×10^5 cellule/cm² su piastre rivestite di MatrigelTM (Becton Dickinson) in medium hES condizionato da MEF con l'aggiunta di 10 ng/ml FGF-2 e 10 μ M ROCK inhibitor (Sigma). Le cellule vengono espanse per tre giorni fino quasi a raggiungere la confluenza. Il medium iniziale di differenziamento è composto da KnockOutTM Serum Replacement medium addizionato di noggin 500 ng/ml (in alternativa 5 μ M dorsomorfina, Sigma) e 10 μ M SB431542 (Tocris), mantenuti fino al giorno 12. Ogni 2 giorni il medium viene sostituito con medium fresco contenente una proporzione crescente di N2 medium (25%, 50%, 75%). A partire dal giorno 5, alla coltura vengono aggiunti 200 ng/ml SHHC-25II (R&D) and 100 ng/ml DKK-1 (Peptidech) mantenuti per 3 settimane. Al giorno 15 l'intera popolazione cellulare viene staccata con Accutase e ripiastrata su piastre rivestite da poly-D-lisina/laminina o Matrigel. Le cellule vengono quindi mantenute in medium di differenziamento terminale composto da N2 medium addizionato di B27 (Invitrogen) e 30 ng/ml BDNF (Peptidech). Il differenziamento delle linee di cellule iPS è stato effettuato senza aggiunta di SHHC-25II e DKK-1 (nella parte di lavoro riguardante la generazione di cellule iPS da pazienti HD).

Estrazione di RNA. L'RNA è stato raccolto in Trizol (Invitrogen) e successivamente estratto; i controlli positivi sono rappresentati da RNA di cervello fetale umano (Clontech) e striato fetale umano. Prima della reazione di trascrizione inversa, l'RNA ha subito un trattamento con DNasi I ed è stato purificato usando il kit RNeasy kit (Qiagen). E' stato retro-trascritto 1 μ g di RNA usando SuperScript RT-III, seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice (Invitrogen).

Analisi di RT-PCR e RT-qPCR. In seguito alla retro-trascrizione, le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume di 25 μ l contenenti 25 ng di cDNA utilizzando l'enzima Taq polymerase (Invitrogen). Il protocollo dettagliato è descritto in Camnasio et al., (2012).

Per le analisi di RT-qPCR, sono state utilizzate due preparazioni di cDNA ottenute da 2 reazioni indipendenti di retrotrascrizione per ogni campione di RNA. Ogni singolo gene è stato analizzato in triplicato utilizzando la macchina CFX96 Real-Time system (Bio-Rad). Tutte le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 20 μ l contenenti 50 ng di cDNA, utilizzando il reagente iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad) come viene descritto in Marullo et al., (2010). Per normalizzare i livelli

di espressione del gene selezionato sono state utilizzate come controllo interno le sequenze *Expressed Alu repeats* (EAR) (Marullo et al., 2010). Le sequenze dei primers, le temperature di allineamento e le lunghezze dei prodotti di PCR sono consultabili in Tabella 1.

Analisi di *microarray*. L'RNA totale è stato estratto da campioni derivati da cellule hES ai giorni 0, 15 e 45 usando l'RNeasy kit (Qiagen). Per la preparazione del cRNA sono stati usati 500 ng di RNA totale derivato da ogni campione, attraverso Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit (Ambion). 750 ng di cRNA marcato sono stati ibridati su Illumina HumanHT-12 v4 *arrays* (Illumina, Netherlands). Ai dati ottenuti è stato sottratto il *background* e sono stati normalizzati usando Illumina *GenomeStudio-GX software*. Le sonde che si sono ibridate sono state filtrate, almeno nel 25% dei campioni, con un criterio di selezione con $p\text{-value} < 0.05$.

L'analisi di espressione dei geni differenzialmente espressi (giorno 0 *versus* giorno 15 o giorno 45) è stata effettuata utilizzando l'algoritmo del modello lineare e il test empirico di Bayes, disponibile nella piattaforma *R-Bioconductor*. La correzione multipla è stata effettuata tramite il metodo di *Benjamini-Hochberg's*. I geni differenzialmente espressi (DEG) hanno superato il criterio del $p\text{-value} < 0.05$ e dell'incremento di espressione di 1.7, usato come soglia. L'analisi gerarchica è stata effettuata utilizzando la correlazione di *Pearson*, implementata nel *MeV package*. È stato identificato nell'analisi gerarchica un gruppo di geni DEG del giorno 15 (*sub-cluster*) che ha un andamento diverso nei campioni del giorno 45 (e vice-versa). Inoltre, la selezione dei *sub-cluster* è stata basata sulla comparazione dei livelli di espressione relativamente al giorno 0. L'analisi di arricchimento delle classi geniche dei processi biologici (*Gene ontology, GO*), è stata effettuata utilizzando il *Genecodis tool*, con significatività statistica di 0.05 (test iper-geometrico corretto con il metodo di *Benjamini-Hochberg's*). L'analisi di arricchimento dei *pathways* è stata effettuata utilizzando il *software Ingenuity pathway analysis* (www.ingenuity.com) con soglia del $p\text{-value} < 0.05$ (Fisher's Exact test, corretto con il metodo di *Benjamini-Hochberg's*).

Immunofluorescenza. Le cellule sono state fissate in 4% PFA, permeabilizzate con 0.5% Triton e bloccate con 5% siero fetale bovino. Gli anticorpi primari, raggruppati in Tabella 2, sono stati incubati *overnight* a 4 °C. Gli appropriati anticorpi secondari coniugati al fluoroforo Alexa 488, 568 o 647, sono stati diluiti 1:500 e incubati insieme a Hoechst 33258 (5 µg/ml; Molecular Probes, Invitrogen), reagente utilizzato per l'identificazione dei nuclei. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio Leica DMI 6000B e analizzate tramite il programma LAS-AF imaging *software*, quindi processate con Adobe Photoshop o ImageJ. Le immagini confocali sono state acquisite utilizzando un microscopio ZEISS LSM 510 dotato di programma AIM 4.2.

Gli esperimenti di immunistoichimica sono stati condotti su fettine di tessuti cerebrali dello spessore di 40 μm e incubate come sezioni flottanti. Gli anticorpi utilizzati sono raggruppati in Tabella 2. In seguito ad incubazione con gli appropriati anticorpi secondari biotinilati, il segnale specifico è stato visualizzato grazie a colorazione con DAB.

Citofluorimetria. Le cellule sono state staccate e fissate con PFA, quindi permeabilizzate in una soluzione contenente 0.2% Tween 20, risospese in FBS ed incubate con l'anticorpo primario di interesse (Tabella 2). Per quanto riguarda il metodo di rivelazione di PAX6, le cellule sono state fissate in 0.1% PFA per 10 minuti a 4 °C, permeabilizzate con 90% metanolo per 30 minuti a 4°C e incubate *overnight* a 4°C. Dopo 3 lavaggi in PBS, è stato aggiunto l'appropriato anticorpo secondario coniugato al fluoroforo Alexa 488 o 647 diluito 1:1000. Come controllo è stato usato un anticorpo primario isotipico. L'analisi è stata condotta utilizzando il citofluorimetro FACS Canto II (BD Bioscience) con il programma BD FACSDiva v6.1.3. Per ogni singola analisi sono state analizzate 10000 cellule.

Raccolta dei tessuti. Il tessuto fetale umano deriva da pazienti che hanno fatto richiesta di interruzione di gravidanza. Tutte le procedure sono state approvate dal comitato etico dell'Università di Milano e di Cambridge, seguendo tutte le normative etiche in accordo con le linee guida del Polkinghorne Report e del Dipartimento della salute. Gli stadi di sviluppo dei feti umani sono stati identificati in accordo all'anatomia stabilita dal The Carnegie Institution for Science in Washington, DC, USA. I tessuti sono stati sottoposti a criosezionatura di 30 μm .

Elettrofisiologia. Le registrazioni sono state effettuate nelle configurazioni *whole-cell voltage-* e *current-clamp*. Le soluzioni extracellulari utilizzate sono descritte in Mauri et al., 2012. Le pipette sono state riempite con (in mM): 130 K-gluconato, 4 NaCl, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 5 CP, 2 Na-ATP, 0.3 Na-GTP (pH 7.25 con KOH). I segnali sono stati registrati come descritto in Onorati et al., 2011. Le correnti indotte da ligandi sono state attivate dall'applicazione di GABA (20 μM), e le correnti spontanee post-sinaptiche GABAergiche (sIPSCs) sono state derivate come descritto in Mauri et al., 2012. Per determinare la possibile modulazione dopaminergica delle correnti indotte dal GABA, sono stati co-applicati con il GABA 100 μM di dopamina o 5 μM di quinpirolo.

Le registrazioni *in vivo* sono state effettuate su fettine dopo trapianto. Il trapianto *in utero* è stato effettuato unilateralmente in feti di ratti all'età gestazionale di E16.5 trapiantando 100,000 cellule GFP⁺ al giorno 45 di differenziamento. Gli animali (P15-27) sono stati anestetizzati con isofluorano e decapitati. L'intero cervello è stato rapidamente prelevato e sommerso in una soluzione fredda

carbossigenata (95% O₂ / 5% CO₂) contenente (in mM): Saccarosio 70; NaCl 80; KCl 2.5; NaHCO₃ 26; Glucosio 15; MgCl₂ 7; CaCl₂ 1; NaH₂PO₄ 1.25. Fettine coronali di 300 µm sono state trasferite in una camera di incubazione riempita con aCSF carbossigenata contenente (in mM): NaCl 125; KCl 2.5; NaHCO₃ 26; Glucosio 15; MgCl₂ 1.3; CaCl₂ 2.3; NaH₂PO₄ 1.25, e costantemente perfuse a temperatura ambiente. La camera di registrazione è stata montata su un microscopio invertito con interferenza di contrasto. La pipetta è stata riempita con la soluzione (in mM): K-gluconato 130; NaCl 4; MgCl₂ 2; EGTA 1; Hepes 10; CP 5; Na₂ATP 2; Na₃GTP 0.3 (pH aggiustato a 7.4 con KOH). Le registrazioni sono state effettuate con MultiClamp 700B amplifier e digitalizzate con Digidata 1322. I dati sono stati acquisiti con il *software* Clampex 9.2, campionato a 20 kHz e filtrato a 10 kHz.

Trapianti. Tutti gli esperimenti con gli animali sono stati effettuati con protocolli approvati dal *Caltech Institutional Animal Care and Use Committee*. La sospensione cellulare è stata trapiantata in nove femmine di ratto Lister hooded. I ratti hanno subito una lesione unilaterale con acido chinolinico all'emisfero destro alle seguenti coordinate: 1. AP: +0.4, ML: -3.4, DV -4.5/-3.5 e 2. AP: +1.4, ML: -2.8 e DV: -4.5/-3.5. Dopo otto giorni dalla lesione è stato iniziato un regime di immunosoppressione con ciclosporina A (1mg/kg, iniezione intraperitoneale). Il giorno seguente cellule al giorno 38 di differenziamento sono state risospese alla concentrazione di 250,000 cellule/µl. È stato iniettato bilateralmente, nella lesione e nell'emisfero intatto, un totale di 2 µl alle seguenti coordinate: AP: +0.9, ML: +/- 3.1, DV: -4.5/-3.5. I ratti sono stati perfusi a 3, 6 e 9 settimane dopo trapianto. I tessuti sono stati perfusi con 1.5% PFA e conservati in PFA per altre 24 ore prima di essere trasferiti in una soluzione di dH₂O al 25% di saccarosio.

Test delle rotazioni indotte da apomorfina. Dopo tre settimane dalla lesione e prima della perfusione, i ratti sono stati iniettati per via sub-cutanea con 1 mg/kg di apomorfina (disciolta in 0.9% di soluzione salina, Sigma). Sono stati posizionati in un rotometro automatico basato sul progetto di Ungerstedt e Arbuthnott (1970) (Torres et al., 2008) e i movimenti sono stati registrati per 60 minuti. I dati sono stati riportati come punteggi controlaterali alla fine di ogni sessione di test.

Produzione dei vettori. Il vettore di riprogrammazione STEMCCA codificante per i quattro fattori (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, e *C-MYC*) è stato gentilmente concesso da G. Mostoslavsky. È stato anche preparato uno *stock* di vettore di riprogrammazione codificante per i tre fattori (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*), come già descritto (Follenzi and Naldini, 2002). Brevemente, cellule 293T sono state co-

trasfettate con i 4 vettori con il metodo del calcio fosfato; i vettori sono pCCLsin.PPT.pA.TK.mCMV.SFFV.OCT3/4_FMDV2A_KLF4_TaV 2A_SOX2.Wpre.3'LTR_loxP transfer vector plasmid (36 µg); il plasmide di *packaging* pMD.Lg/pRRE (12.5 µg); the pMD2.VSV-G envelope-encoding plasmid (9 µg); e pCMV-Rev (6.25 µg). I quattro vettori sono stati aggiunti alle cellule in piastre da 15 cm, ed è stato aggiunto 1 mM sodio butirato al medium raccolto. Le particelle virali sono state concentrate di 250 volte tramite ultracentrifugazione e misurate con HIV-1 Gag p24 *immunocapture assay* (Perkin Elmer).

Coltura di fibroblasti ed infezione. Biopsie di pelle sono state ottenute da pazienti dell'istituto neurologico "C. Besta" di Milano. I pazienti hanno fornito il loro consenso scritto per l'uso delle biopsie e per il loro utilizzo a scopo di ricerca. I fibroblasti sono stati coltivati in DMEM *high glucose* (Euroclone), 10% FBS (Euroclone), 2 mM L-Glutamine (Euroclone), and 1% penicillina/streptomina (Invitrogen). Sono state piastrate 1.5×10^4 cellule in piastre da 6-well ed è stata effettuata l'infezione con il costrutto lentivirale policistronico codificante per i fattori di trascrizione *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* (OSK, con o senza *C-MYC*), in presenza di 4 µg/ml di polibrene. Dopo una settimana, i fibroblasti infettati sono stati ripiastrati su un *feeder layer* di fibroblasti murini embrionali (MEFs dallo *strain* CD1, 3.5×10^4 cellule/cm²) o su fibroblasti neonatali Foreskin (3.5×10^4 cellule/cm²) in Knock-out-DMEM (Invitrogen) addizionato con 20% Knock-out serum replacement (Invitrogen), 2 mM L-Glutamine (Euroclone), 2 mM di amminoacidi non essenziali (Invitrogen), 1% penicillina/streptomina (Invitrogen) e 0.1 mM β-mercaptoetanol (Invitrogen), con 10 ng/ml di bFGF (Invitrogen). Le colonie hanno iniziato ad apparire dopo 30 giorni. Intorno al giorno 40 sono state isolate e trasferite su un nuovo *feeder-layer* con le stesse condizioni di cultura. I cloni di cellule iPS sono stati poi passati manualmente ogni 5-7 giorni e le regioni indifferenziate sono state trasferite su un nuovo *feeder-layer*. Nei nostri esperimenti sono state utilizzate solo colonie indifferenziate.

Differenziamento verso corpi embrioidi. Sono state distaccate colonie intere di cellule hES, WT e HD-iPS tramite incubazione con Collagenasi IV (Invitrogen) per 40 min; successivamente le cellule sono state coltivate in medium hES senza l'aggiunta di bFGF. Dopo 7 giorni si sono formati gli EBs, poi piastrati su gelatina 0.1% (Sigma Aldrich) e il medium è stato cambiato ogni 3 giorni.

Saggio del teratoma. Per verificare la pluripotenza delle cellule HD-iPS *in vivo*, queste sono state manualmente staccate dal *feeder-layer* di fibroblasti umani e risospese in MatrigelTM (BD, Becton Dickinson). Successivamente, sono stati iniettati per via sub-cutanea 200 µl di cellule risospese in

Matrigel (~10⁶ cellule), in quattro topi, con severa immunodeficienza combinata (SCID), a 7 settimane di età (C.B.-17/GbmsTac-scid-bgDF N7, M&B, Ry, Denmark). Come controllo sono stati iniettati altri quattro animali con un'altra preparazione di cellule derivate dalla stessa linea cellulare. I topi sono stati seguiti, ed è stata osservata la formazione di teratoma. Dopo sei settimane i topi sono stati sacrificati e sono stati prelevati i teratomi, successivamente fissati in 4% PFA, preparati per l'istologia e inclusi in paraffina. La morfologia dei tessuti è stata analizzata dopo marcatura con ematossilina ed eosina. Per verificare la presenza delle diverse strutture sono state effettuate diverse marcature tramite Bond-Max automatic immunostainer (Leica Microsystems) con anticorpi diretti contro Alfafetoproteina (AFP) (Novocastra), Glipicano3 (GPC3) (Biomosaics) e OCT 3/4 (Novocastra).

Analisi di espressione genica. Sono stati analizzati 36 ng di cDNA preparato in duplicato tramite il termociclatore 7 Real-time PCR con Hs03005111_91 TaqMan® *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems). È stato analizzato OCT4 e i seguenti primers e sonde sono stati utilizzati per amplificare i trascritti derivati dal vettore (per identificare la sequenza 3'UTR del vettore): Forward primer: 5'-GGCTGTTGGGCACTGACAAT-3' 900 nM, Reverse primer: 5'-ACGTCCCGCGCAGAATC-3' 900 nM, Probe: 5'-6-FAM-TTTCCATGGCTGCTCGCCGT-MGB-3' 250 nM. Sono state usate le condizioni standard per l'amplificazione tramite TaqMan. È stato usato il *software* T Viiia 7 RUO Software 1.0 per estrarre i dati (Ct e fluorescenza di base). L'espressione relativa di ogni gene è stata calcolata con il metodo $\Delta\Delta C_t$, normalizzata sull'espressione del gene *HPRT* (gene *housekeeping*). I risultati sono presentati come incremento relativo rispetto ai fibroblasti infettati da 10 giorni.

Analisi del numero di copie del vettore. L'analisi di PCR quantitativa è stata effettuata come descritto in (Lombardo et al., 2007). Brevemente, 200 ng di DNA genomico è stato analizzando con i *primers* e le sonde complementari alla sequenza del vettore *backbone* (ψ -PBS) e al gene umano *TERT*; quest'ultimo usato per la normalizzazione. È stata generata una curva standard del ψ -PBS tramite diluizioni seriali di DNA di cellule umane contenenti un numero noto di integrazioni del vettore.

Estrazione del DNA. Le colonie di cellule iPS sono state isolate meccanicamente da piastre di 3.5 cm. Le cellule sono state raccolte e il DNA è stato estratto con il kit Nucleospin Kit (Macherey Nagel) in accordo con le istruzioni del produttore.

Analisi dell'espansione del tratto CAG. L'analisi di amplificazione dei frammenti di PCR è stata

effettuata con l'enzima *Taq Gold Polymerase* in presenza dell'1% di DMSO e 1.5 mM MgCl₂ per 30 cicli. Ogni ciclo consiste di uno step di denaturazione a 94°C per 1 min, poi uno step di *annealing* a 65°C per 1 min, e uno step di polimerizzazione a 72°C di 2 min. La lunghezza dei frammenti di PCR è stata determinata tramite elettroforesi capillare con *ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer*.

Marcatura con LysoTracker. Le cellule sono state incubate per 30 min a 37°C nel medium dello stato di proliferazione contenente 50 nM LysoTracker® Red DND-99 (Molecular Probes, Invitrogen). Poi le cellule sono state incubate per 15 min a 37°C con Hoechst 33258 (5 µg/ml, Molecular Probes, Invitrogen). Le misure di citofluorimetria a flusso sono state effettuate su cellule vive esposte a 200 nM LysoTracker® Dye con il FACS Canto II (BD Bioscience). I dati sono stati analizzati con il *software* BD FACSDiva v6.1.3.

Analisi statistiche. Per comparare i campioni sono stati usati il test-T di Student e il *one-way* ANOVA e il test post hoc di Dunnet. *P values*, SEM, e le medie sono state calcolate con il programma *Graph Pad Prism version 4.0*.

Il lavoro di questa Tesi è confluito in due manoscritti originali:

-“*Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation towards authentic DARPP-32+ medium-sized spiny neurons*”.

Alessia Delli Carri, Marco Onorati, Mariah J. Lelos, Valentina Castiglioni, Andrea Faedo, Ramesh Menon, Stefano Camnasio, Romina Vuono, Paolo Spaiardi, Francesca Talpo, Mauro Toselli, Gianvito Martino, Roger A. Barker, Stephen B. Dunnett, Gerardo Biella and Elena Cattaneo.

Development 140, 0000-0000 (2013) doi:10.1242/dev.084608

* co-first authors

-“*The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity*”.

Camnasio S*, Delli Carri A*, Lombardo A, Grad I, Mariotti C, Castucci A, Rozell B, Riso PL, Castiglioni V, Zuccato C, Rochon C, Takashima Y, Diaferia G, Biunno I, Gellera C, Jaconi M, Smith A, Hovatta O, Naldini L, Di Donato S, Feki A, Cattaneo E.

Neurobiol Dis. 2012 Apr;46(1):41-51. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.042.

* co-first authors

Tabella 1

Gene	Forward primer	Reverse primer	Ta °C	Ampli con (bp)
<i>GAPDH</i>	AGCTGAACGGGAAGCTCACT	AGGTCCACCACTGACACGTTG	60	67
<i>PAX6</i>	TCCATCAGTTCCAACGGAGAA	GTGGAATTGGTTGGTAGACAC	60	337
<i>DACH1</i>	GTGGAAAACACCCCTCAGAA	CTTGTTCCACATTGCACACC	57	208
<i>LIX1</i>	ATGAGTCACTGCCAGCTCCT	GTGGAGGCTACTGCTTCCTG	59	217
<i>LMO3</i>	GGGCTCCACCCTGTACACTA	TAGTCCGTCTGGCAAAGGAT	57	243
<i>MSX1</i>	CCTTCCCTTTAACCCTCACAC	CCGATTTCTCTGCGCTTTTCT	58	285
<i>OTX1</i>	CGTTCACAGCTGGACGTG	CTTTCGGAGCCCGAGCTC	60	230
<i>OTX2</i>	TCAACTTGCCCGAGTCGAGG	CAATGGTCGGGACTGAGGTG	61	204
<i>SIX3</i>	CCGGAAGAGTTGTCCATGTT	CGACTCGTGTTTGTGATGG	57	171
<i>GBX2</i>	CTCGCTGCTCGCCTTCTC	GCCAGTCAGTCAGATTGTCATCC G	62	173
<i>EMX2</i>	GGGATCCGTCCACCTTCTAC	CTCAAAGGCGTGTTCCAGCC	61	374
<i>FOXP2</i>	GCTTTGACAGTGAGCTAGCTTC	CTGGTGTCACCACTTGATCTTC	58	280
<i>ASCL1</i>	GTCCTGTCGCCACCATCTC	CCCTCCCAACGCCACTGAC	64	215
<i>FOXP1</i>	TGTTGACTCAGAACTCGCTGG	CTGCTCTGCGAAGTCATTGAC	60	262
<i>DLX5</i>	TTCAGAAGACTCAGTACCTCGC	GAGTTACACGCCATTGGGTC	60	184
<i>DLX6</i>	TACCTCCAGTCCTACCACAAC	AATAAATGGTCCGAGGCTTCCG	60	145
<i>FOXP1</i>	CTACCGCTTCCATGGGAAATC	CTGTTGTCACTAAGGACAGGG	59	207
<i>ISL1</i>	TACAGGCTAACCCAGTGGAAG	GACTGGCTACCATGCTGTTAG	60	207
<i>DrD1</i>	AGGGACATGTCTTTGGCTTCAG	GGGAACAGTGTTAGCACCTGTT	60	173
<i>ARPP-21</i>	GTGCAAAGCGTGATGGTTTCC	CCTTGACCTGCCTGGTTAGG	58	128
<i>DARPP-32</i>	CTGAGGACCAAGTGGAAGAC	GATGTCCCCTCCACTTCCTC	58	125
<i>NKX2-1</i>	ACCGGGTTCAGACTCAGTTC	ATCGACATGATTCGGCGTCGG	60	221
<i>EAR</i>	GAGGCTGAGGCAGGAGAATCG	GTCGCCAGGCTGGAGTG	60	88

Tabella 2

	Antibody	Dilution	Supplier
IF	OCT4	1:100	Santa Cruz
	OTX2	1:500	Chemicon
	α smooth muscle actin	1:800	Sigma
	GATA4	1:200	Santa Cruz
	p75	1:200	Santa Cruz
	PAX6	1:200	Covance
	nestin	1:200	R&D
	SOX1	1:200	Santa Cruz
	FOXP1	1:1000	StemCulture
	GSX2	1:2000	gift from Prof. Campbell
	β III-tubulin	1:1000	Sigma
	MAP2	1:500	BD Bioscience
	calbindin	1:200	SWANT
	GABA	1:500	Sigma
	GAD65/67	1:200	Millipore
	FOXP1	1:1000	Abcam
	FOXP2	1:2000	Abcam
	CTIP2	1:500	Abcam
	DARPP-32	1:200	Epitomics
	DrD2	1:200	Millipore
	A2A	1:1000	Upstate
	Synaptophysin	1:200	Sigma
	5-HT	1:500	Sigma

	TH	1:200	Immunological Science
	VGLUT1	1:300	Millipore
	GFAP	1:1000	DAKO
	calretinin	1:200	BD Bioscience
	NPY	1:5000	Immunostar
	Parvalbumin	1:500	Chemicon
	Somatostatin	1:100	Millipore
	ChAT	1:200	Chemicon
	TRA-1-81	1:50	Gift from ESTOOLS
	SOX2	1:200	Millipore
	Phospho Histone H3 (PH3)	1: 100	Celli Signaling
IHC	human nuclei	1:1000	Millipore
	FOXP1	1:1000	StemCulture
	human nestin	1:500	Neuromics
	MAP2	1:500	Sigma
	Ki67	1:500	DAKO
	N-cadherin	1:100	BD Bioscience
	ZO-1	1:100	Invitrogen
	OTX2	1:1000	Chemicon
	FOXP1	1:500	Abcam
	DARPP-32	1:200	Epitomics
	DARPP-32	1:30000	gift from Prof. Hemmings, Cornell University
	α smooth muscle actin	1:500	Sigma
	SOX1	1:150	Santa Cruz
	OCT4	1:100	Santa Cruz

	FOXP2	1:2000	Abcam
	GFAP	1:4000	DAKO
FACS	OCT4	1:100	Santa Cruz
	OTX2	1:1000	Chemicon
	PAX6	1:5000	Hybridoma bank
	FOXG1	1:1000	StemCulture

Risultati

1. Messa a punto di un protocollo per il differenziamento diretto, *in vitro*, di cellule staminali pluripotenti verso neuroni con caratteristiche di MSNs

1.1 Cellule staminali pluripotenti, esposte a segnali estrinseci appropriati, acquisiscono un destino telencefalico ventrale

L'informazione posizionale è una caratteristica generale che organizza e determina l'identità cellulare sulla base della loro posizione anatomica negli organismi multicellulari. Per ottenere ciò è necessario che vengano espresse in maniera sequenziale e organizzata, diverse combinazioni di fattori di trascrizione specifici delle diverse zone del CNS.

Per la messa a punto del nostro protocollo di differenziamento ci siamo continuamente riferiti alle diverse tappe del neurosviluppo *in vivo*, in modo da identificare e seguire nel tempo fattori di trascrizione specifici delle diverse fasi. Questi sono poi stati assunti come riferimento per ricapitolare, *in vitro*, i diversi stadi di sviluppo del telencefalo e dello striato. Come età gestazionale di riferimento, abbiamo preso in considerazione tessuto fetale umano di 11 settimane, ottenuto grazie alla collaborazione del laboratorio del Prof. Barker dell'Università di Cambridge. A questa età gestazionale il telencefalo in formazione esprime il marcatore di telencefalo e mesencefalo OTX2 (Fig. 1.1A) (Nat and Dechant, 2011), e FOXG1, specifico del telencefalo (Manuel et al., 2010) (Fig. 1.1B). Già all'undicesima settimana nel *subpallium*, la zona subventricolare e la zona ventricolare (rispettivamente SVZ e VZ) dell'LGE esprimono marcatori regionali chiave, quale GSX2 (Fig. 1.1C), che identifica i progenitori striatali precoci che daranno origine agli MSNs (Nat and Dechant, 2011) (Fig. 1.1D,E). Il protocollo che abbiamo messo a punto, completamente in monostrato e privo di co-cultura con altri tipi cellulari, permette di generare progenitori esprimenti OTX2, FOXG1 e GSX2, che differenzieranno poi terminalmente verso neuroni striatali (Fig. 1.1F). Il protocollo consiste in tre diverse fasi: (i) induzione neurale, (ii) regionalizzazione e (iii) differenziamento terminale (Fig. 1.1F). Per quanto riguarda la prima fase, l'induzione neurale si basa sul metodo descritto da Chambers e colleghi nel 2009, basata sulla doppia inibizione della via di SMAD, tramite l'azione di noggin ed SB431542 (vedi introduzione). Da tempo è stato dimostrato in letteratura che la dorsomorfina, inibitore di BMP, è in grado di indurre efficientemente l'induzione neurale (Zhou et al., 2010). Considerata questa evidenza, nel protocollo sviluppato è stato usato indistintamente noggin o dorsomorfina, in combinazione con SB431542, osservando un'efficienza comparabile (dati non mostrati). Le cellule neuroepiteliali differenziano verso il

destino telencefalico tramite fasi successive di regionalizzazione R-C e D-V, che prevedono l'esposizione a morfogeni ventralizzanti, quali SHH (Ericson et al., 1995; Kohtz et al., 1998). Inoltre, è stato ampiamente dimostrato come progenitori telencefalici derivati da cellule hES possono essere indirizzati verso l'identità ventrale tramite la contemporanea inibizione del *pathway* di WNT indotta da DKK-1 (vedi introduzione). Considerato ciò, per la fase di induzione neurale abbiamo piastrato 0.7×10^5 cellule/cm² e le abbiamo lasciate proliferare fino al raggiungimento della confluenza (Fig. 1.1G). A questo punto sono stati aggiunti al *medium* dorsomorfina (o noggin) ed SB431542, mantenuti poi per 12 giorni. Circa al giorno 15 è stata osservata la presenza di rosette neurali, (Fig. 1.1H). A partire dal giorno 5 viene iniziata la fase di regionalizzazione tramite l'aggiunta coordinata di DKK-1 e della versione modificata di SHH (SHH C-25II, modificato a livello di una cisteina ha un'azione potenziata di circa 10 volte). L'azione dei morfogeni è stata mantenuta per le successive tre settimane, mentre i progenitori ottenuti (circa al giorno 15) sono stati poi ripiastrati e terminalmente differenziati fino al giorno 80 (Fig. 1.1I,J).

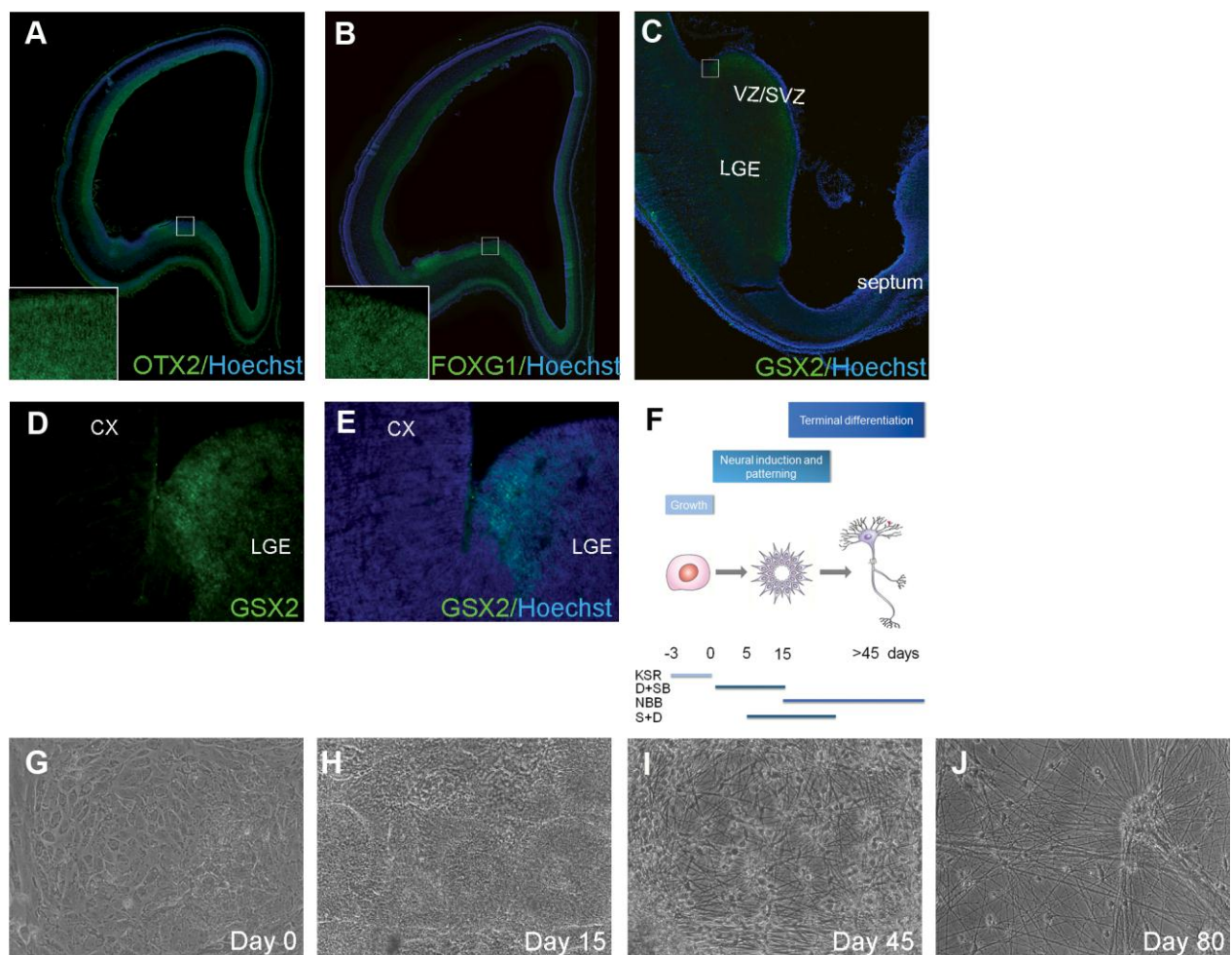


Fig. 1.1. Il protocollo di differenziamento sviluppato comprende diverse fasi, completamente in monostrato e in assenza di co-cultura con altri tipi cellulari.

(A-C) Immunocitochimica su sezioni coronali di tessuto di telencefalo umano all'età gestazionale di 11 settimane. (A) OTX2 e (B) FOXP1 mostrano un'espressione diffusa nelle vescicole telencefaliche (ingrandimento 5X, riquadro ingrandimento 20X). (C) GSX2 è espresso specificamente nell'eminenza ganglionare laterale (LGE) (ingrandimento 5X). (D,E) ingrandimento 20X del riquadro in (C). (F) Rappresentazione schematica del protocollo di differenziamento. (G-J) Fasi principali del processo di differenziamento (ingrandimento 10X).

Per verificare che l'azione dei morfogeni avesse realmente effetto nell'indirizzamento verso il destino ventrale-telencefalico, abbiamo analizzato il rapporto tra *EMX2* (marcatore del *pallium* dorsale) e *NKX2-1* (marcatore di MGE), come indice dell'identità D-V acquisita dai progenitori generati. In presenza dei morfogeni (+F) l'indice D-V è spostato verso il destino ventrale, se comparato con la condizione in assenza di morfogeni (-F) (Fig. 1.2A). Per monitorare l'avvenuta conversione neurale e la corretta regionalizzazione, abbiamo inoltre analizzato, tramite RT-PCR, il profilo di espressione di un pannello di marcatori diagnostici per il neuroectoderma e per le diverse regioni del SNC (Fig. 1.2B). A partire dal giorno 5, è stata osservata l'espressione dei marcatori del neuroectoderma *PAX6* e *SOX1* (Zhang et al., 2001) e dei marcatori di rosette *DACHI*, *LIX1*, *LMO3* e *MSX1* (Elkabetz et al., 2008) (Koch et al., 2009). L'identità regionale è stata analizzata mediante marcatori regionali specifici dell'asse D-V e R-C. Da questa analisi è emerso che i marcatori rostrali *OTX1*, *OTX2*, e *SIX3* (Appolloni et al., 2008; Nat and Dechant, 2011) e i geni telencefalici-ventrali *DLX5*, *DLX6* e *ASCL1* (Nat and Dechant, 2011), sono correttamente espressi (Fig. 1.2B). Al giorno 5 l'espressione del marcatore caudale *GBX2* inizia a diminuire, compatibilmente con l'adozione dell'identità anteriore.

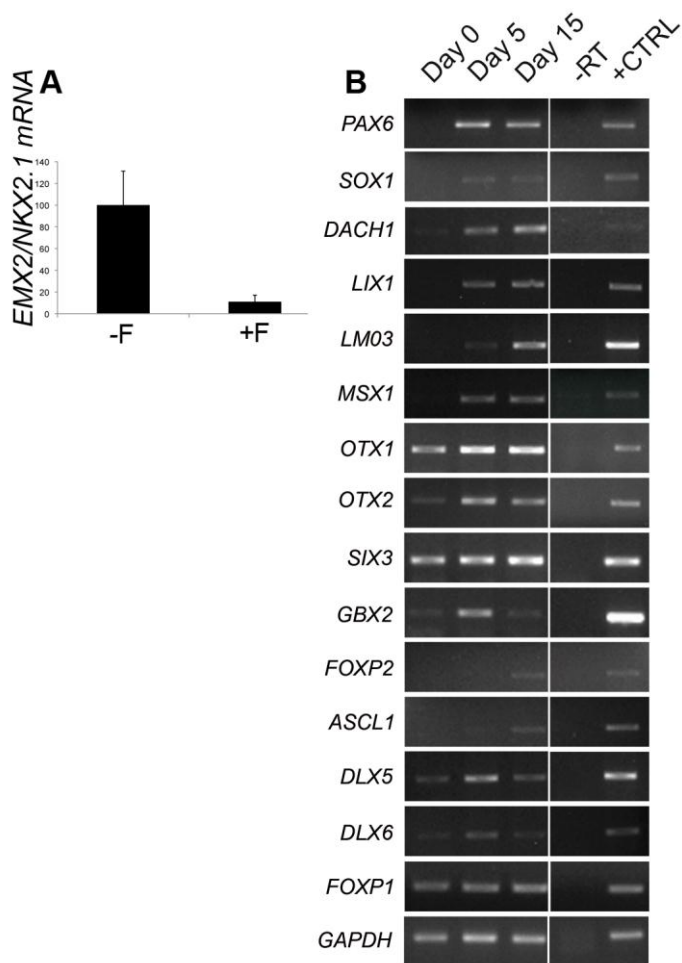


Fig. 1.2. L'analisi di RT-qPCR e RT-PCR suggerisce una corretta acquisizione dell'identità telencefalica ventrale dei progenitori generati.

(A) L'indice di acquisizione dell'identità D-V durante la fase di induzione neurale è rappresentato dal rapporto fra l'espressione di *EMX2* e *NKX2-1* al giorno 15 del differenziamento, nella condizione +SHH/DKK-1 (+F) e in assenza di morfogeni (-F). Le colonne rappresentano la media di tre esperimenti \pm SD. I dati sono espressi come percentuale sulla condizione -F. (B) Analisi di RT-PCR per marcatori del neuroectoderma e regionali. -RT, controllo senza trascrittasi inversa; + CTRL, cDNA da tessuto striatale fetale umano.

Considerando queste evidenze, è possibile affermare che i progenitori neurali generati acquisiscono correttamente il destino telencefalico-ventrale, compatibilmente con gli stessi eventi che accadono *in vivo*. Il corretto susseguirsi di questi eventi è stato ulteriormente confermato tramite immunofluorescenza. L'espressione di OCT4 è completamente persa a partire dal giorno 5 (Fig. 1.3A'), mentre le cellule esprimono i marcatori di neuroectoderma OTX2 (Fig. 1.3A-A''), PAX6 e nestin (Fig. 1.3B-B''). In accordo con lavori precedenti (Li et al., 2009b; Zhang et al., 2010b), l'espressione di SOX1 è stata osservata al giorno 15, successivamente a quella di PAX6 (Fig. 1.3C'). L'identità telencefalica è stata invece confermata dalla presenza di FOXP1 (al giorno 15

presente in circa il 58% delle cellule), e la specificazione ventrale da GSX2 (al giorno 15 presente in circa il 67% delle cellule) (Fig. 1.3D,E). L'analisi tramite citofluorimetria ha ulteriormente confermato il passaggio dallo stadio pluripotente a quello neuroectodermico dei progenitori generati, mostrando che l'88% delle cellule al giorno 15 è OTX2⁺/OCT4⁻ (Fig. 1.3F). Inoltre, considerando PAX6 come indice di conversione neurale, si può affermare che il 64% delle cellule al giorno 15 ha acquisito il destino neuroectodermico (Fig. 1.3F).

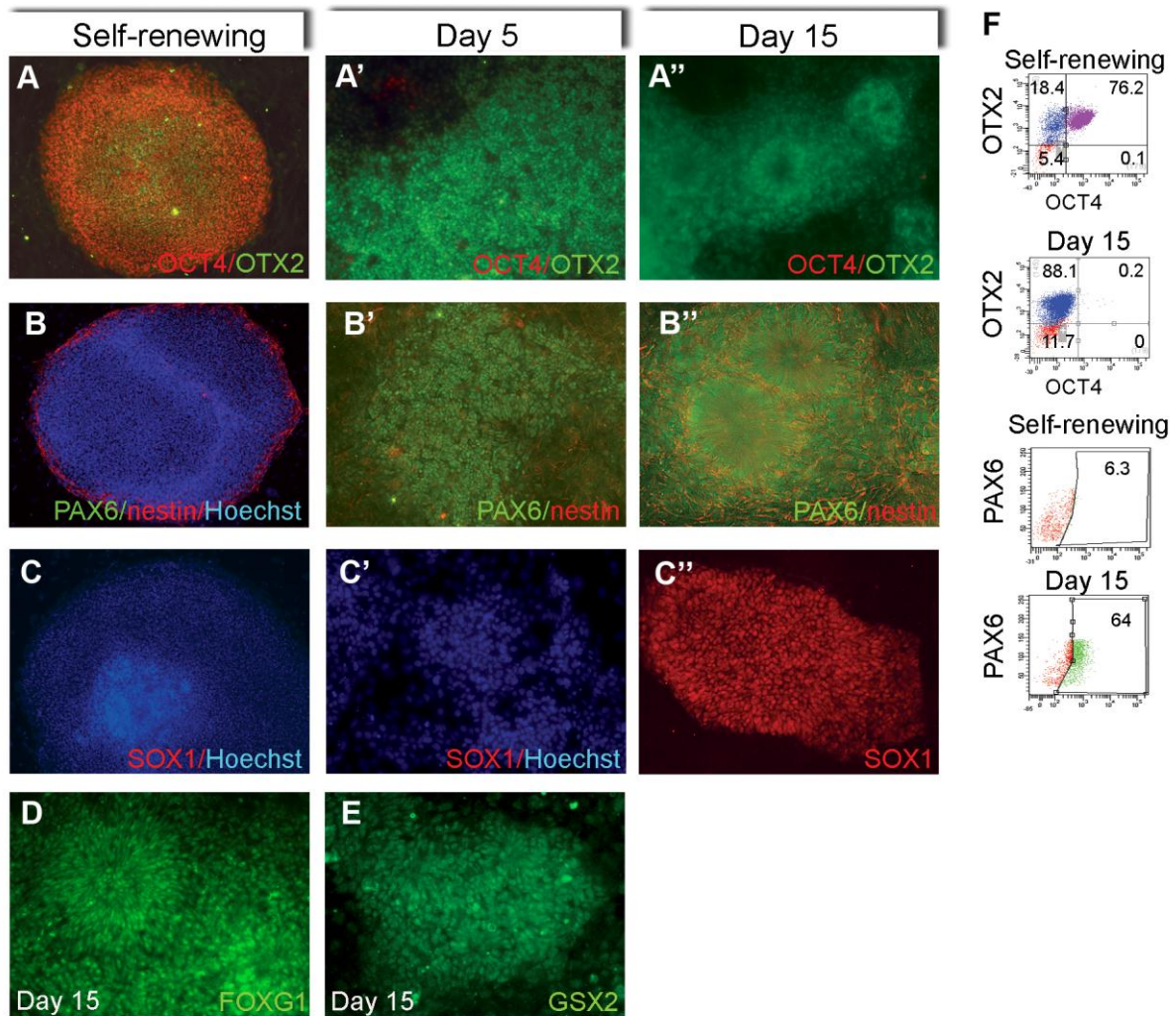


Fig. 1.3. Alla fine dell'induzione neurale le cellule assumono un'identità neurale omogenea esprimendo marcatori telencefalici ventrali.

(A-A'') Analisi di immunofluorescenza durante l'induzione neurale per OCT4/OTX2, (B-B'') PAX6/nestin, e (C-C'')SOX1. (D) Immunocitochimica al giorno 15 per FOXG1. $58 \pm 7.5\%$ delle cellule esprimono FOXG1 (n = 3292 cellule totali, 3 esperimenti). (E) $63.7 \pm 8\%$ delle cellule (n = 3570 cellule totali) sono GSX2⁺ al giorno 15 (ingrandimento 20X). (F) Citometria di flusso in condizione di proliferazione *versus* il giorno 15 per OCT4/OTX2 e PAX6.

In parallelo abbiamo eseguito un'analisi di profilo di espressione genica *genome-wide* sulla fase di

induzione neurale, sfruttando la tecnologia *Illumina*, in collaborazione con il gruppo del Prof Martino dell'Istituto S. Raffaele. I campioni sono stati ibridati con un chip *Illumina* v.4 contenente più di 47.000 sonde che coprono l'intero trascrittoma umano. Analisi di *clustering* hanno permesso di identificare i geni differenzialmente espressi al giorno 15 rispetto al giorno 0 (hES in proliferazione) (Fig. 1.4A). Analisi di arricchimento genico e di *Gene Ontology* (GO) hanno rivelato la presenza di classi geniche arricchite al giorno 15 associate al “*nervous system development*”, “*cytoskeleton organization*” e all’ “*axonal fasciculation*” (Fig. 1.4B). Analisi di *sub-clustering* hanno permesso di evidenziare l'arricchimento di trascritti di geni-candidati specifici per il destino striatale, come *LIX1*, *NOLZ-1/ZNF503*, e *CXCR7*, validati *on-line* tramite il database Allen <http://human.brain-map.org>. (Fig. 1.4C,D).

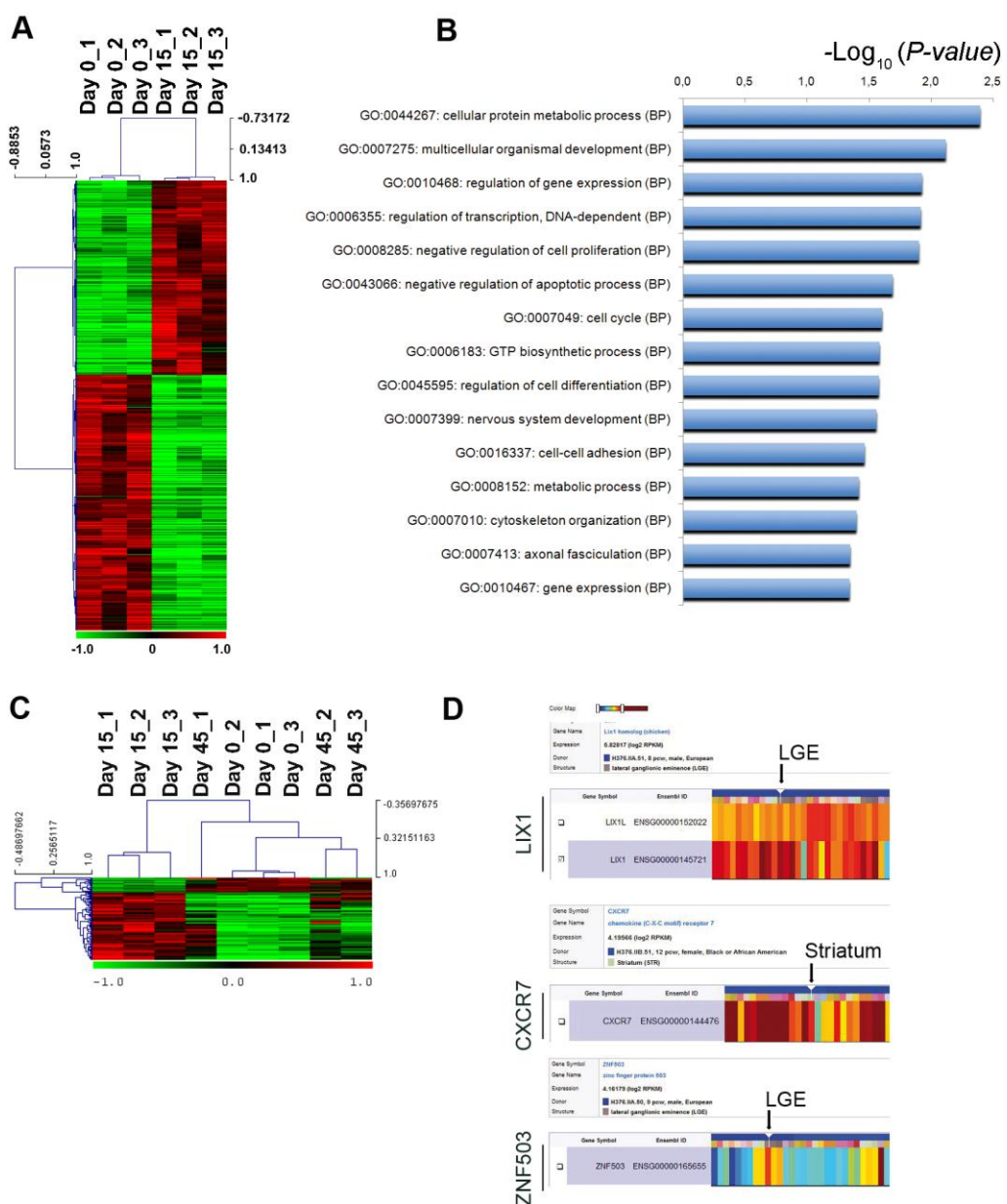


Fig. 1.4. Profilo trascrizionale dell'induzione neurale tramite analisi di *genome-wide gene expression*.

(A) Profilo trascrizionale differenziale tra il giorno 0 e il giorno 15 del differenziamento. (B) Selezione di

geni e di classi geniche neurali arricchite e selezionate tramite GO, ottenute tramite *Genecodis tool*. (C) Analisi di *sub-cluster* stadio-specifica del profilo trascrizionale del giorno 15. (D) Geni candidati come marcatori specifici di LGE derivanti dalla analisi DEG nel *sub-cluster*, validata tramite il *database Allen* <http://human.brain-map.org>.

I risultati ottenuti dimostrano che il profilo trascrizionale osservato alla fine dell'induzione neurale è compatibile con il differenziamento neurale in atto.

Successivamente, ci siamo chiesti se il protocollo messo a punto fosse riproducibile tra più linee cellulari pluripotenti. A questo scopo, è stata eseguita una comparazione di efficienza e di applicabilità del protocollo tra la linea di cellule hES H9, usata fin'ora, e una seconda linea di cellule hES HS401 e la linea di cellule hiPS DF3F (ottenuta tramite riprogrammazione di fibroblasti adulti, vedi risultati par. 2.1, chiamate WT-iPS 3F-1). Dopo 15 giorni di differenziamento, entrambe le linee hanno espresso correttamente OTX2, PAX6, nestin, SOX1 e FOXG1 (Fig. 1.5).

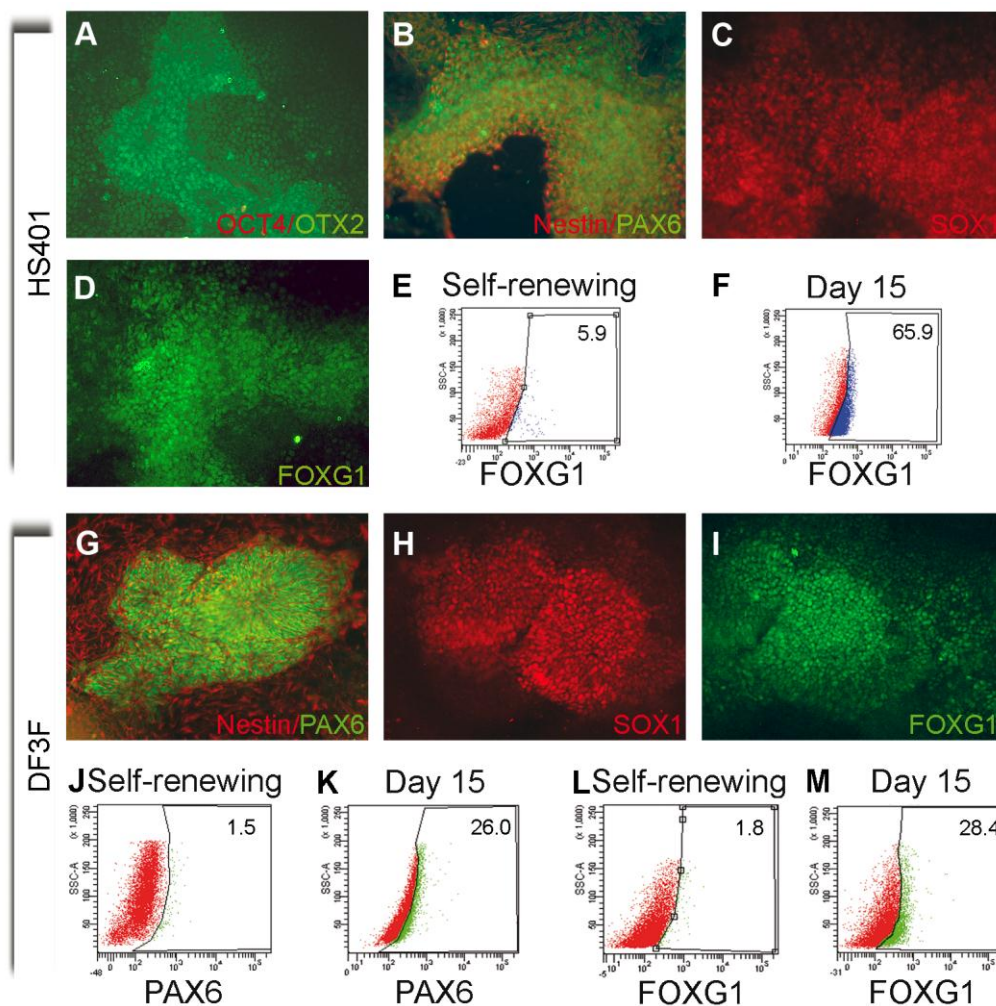


Fig. 1.5. Il protocollo messo a punto è replicabile su altre linee di cellule hES e di cellule hiPS.

(A) Immunofluorescenza per OCT4 e OTX2 della linea di cellule hES HS401 al giorno 15. (B,C) PAX6, nestin, e SOX1 sono espressi nelle cellule neuralizzate. (D) Cellule FOXG1⁺ appaiono alla fine

dell'induzione neurale e durante la fase di regionalizzazione. (E,F) Analisi di citometria di flusso sui progenitori neurali generati. Al giorno 15 del differenziamento il 65.9% delle cellule esprime FOXG1. (G,H) I marcatori del neuroectoderma nestin, PAX6 e SOX1 sono espressi al giorno 15 nella linea di cellule hiPS DF3F. (I) L'espressione di FOXG1 rivela la comparsa di progenitori telencefalici (ingrandimento 20X). (J-M) Analisi di citometria di flusso durante la conversione neurale per PAX6 e FOXG1. Al giorno 15 il 26% delle cellule è PAX6⁺ e il 28.4% è FOXG1⁺.

Considerando i dati ottenuti, è possibile concludere che l'insieme dei segnali estrinseci necessari per l'induzione neurale e per la regionalizzazione telencefalica applicati durante la prima fase del protocollo, sono sufficienti per generare progenitori neurali con identità telencefalica-ventrale a partire da cellule staminali pluripotenti.

1.2 Il differenziamento a breve termine dei progenitori telencefalici-ventrali generati, porta all'ottenimento di neuroni GABAergici con identità di MSNs

Dall'analisi istologica su tessuto fetale umano all'età gestazionale di 11 settimane, si evince che a questo stadio nell'LGE sono espressi i fattori di trascrizione FOXP1 e FOXP2, i quali marcano precursori striatali e MSNs (Fig. 1.6A,B). E' stata inoltre osservata l'espressione di CTIP2, un altro fattore di trascrizione specificamente espresso dai MSNs nello striato di topo, che marca questa popolazione neuronale già dalla fase precoce post-mitotica (Arlotta et al., 2008) (Fig. 1.6C,D). Inoltre nel caudato i neuroni CTIP2⁺ co-esprimono il marcatore specifico di MSNs DARPP-32, il quale è normalmente presente nel 95% dei MSNs e non è espresso da nessun altro tipo cellulare dello striato (Ouimet et al., 1984; Ouimet et al., 1998) (Fig. 1.6C,D).

Per quanto riguarda il differenziamento *in vitro*, al giorno 15-20 del differenziamento, le rosette generate vengono dissociate e ripiastrate ad una densità inferiore su substrati in grado di favorire il differenziamento neurale, come la poli-D-lisina/laminina. Questo processo favorisce il differenziamento terminale verso neuroni maturi. A partire dal giorno 45 del differenziamento, circa l'80% delle cellule esprime β III-tubulina, marcatore neuronale, e sono già presenti neuroni maturi positivi per MAP2 e TAU, in grado di formare complesse reti (Fig. 1.6E). La maggior parte dei neuroni generati mostra, come atteso, un fenotipo GABAergico, confermato dall'analisi di immunofluorescenza per la glutammato decarbossilasi (GAD) 65/67, GABA e calbindina (CALB1) (Fig. 1.6F-H). In questo stadio, inoltre, le cellule sono risultate positive per FOXP1, FOXP2 e CTIP2 (Fig. 1.6I-K), cominciano a comparire alcuni neuroni positivi per DARPP-32 (Fig. 1.6L).

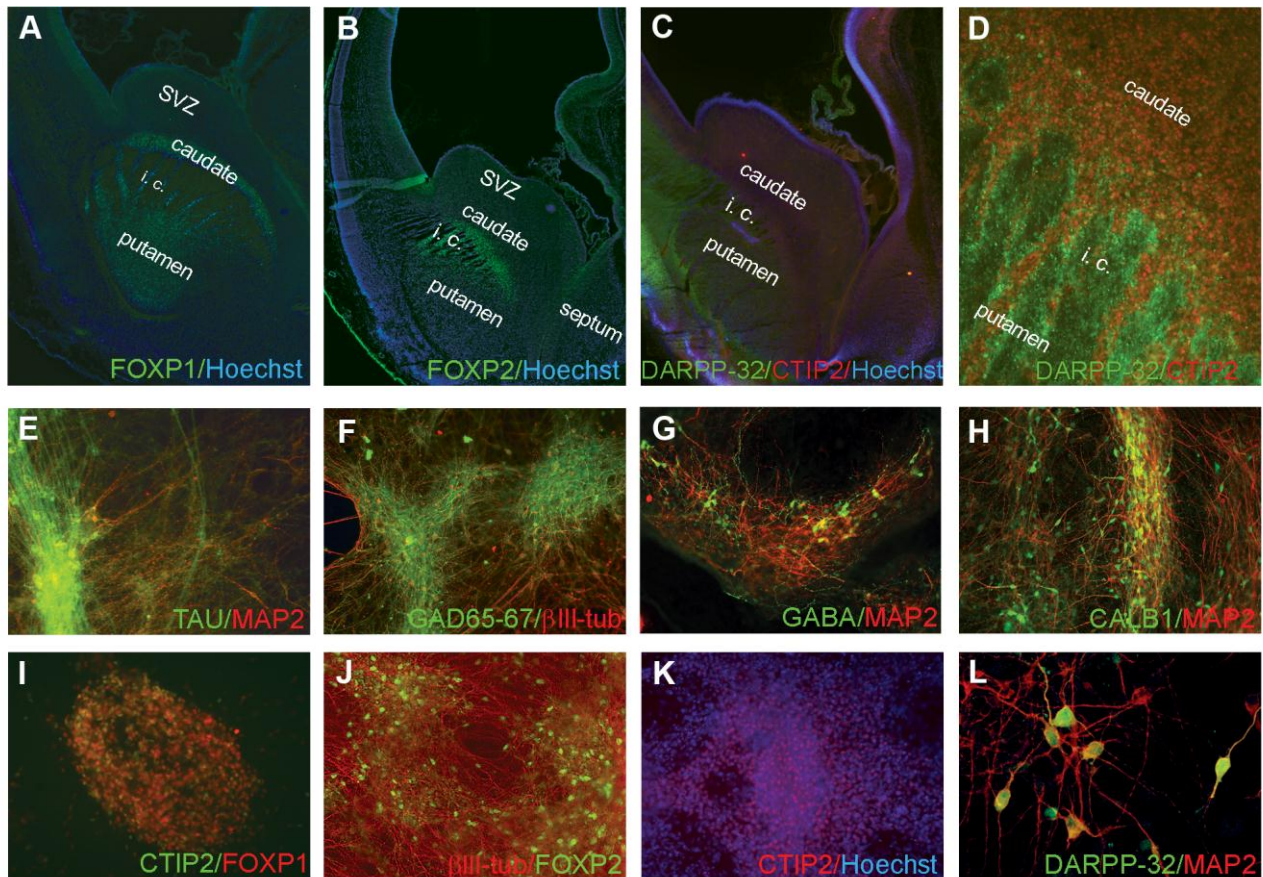


Fig. 1.6. Dopo 45 giorni di differenziamento i neuroni generati mostrano fenotipo GABAergico.

(A) FOXP1 e (B) FOXP2 marcano i precursori striatali nel caudato e nel putamen di tessuto fetale umano di 11 settimane (i.c., capsula inetrna; SVZ, zona subventricolare) (ingrandimento 5X). (C-D) Le sezioni sono state marcate per CTIP2 e DARPP-32 (ingrandimento 5X). (D) ingrandimento 20X del riquadro in (C). (E) Espressione dei marcatori pan-neuronali MAP2ab e TAU. Immunofluorescenza per (F) GAD65/67, (G) GABA, e (H) calbindin (CALB1). (I,J) FOXP1 e FOXP2 espressi nelle cellule striatali differenziate. (K) Il marcatore post-mitotico precoce CTIP2 è espresso nelle cellule neuronali. (L) Immagine confocale che mostra cellule DARPP-32⁺ cells (E-K ingrandimento 20X, L ingrandimento 40X).

Ripetendo la stessa analisi di *profiling* trascrizionale, già effettuata sull'induzione neurale, anche sulla fase di differenziamento terminale e più specificamente al giorno 45, è stato confermato un cambiamento globale dei trascritti in senso neuronale (Fig. 1.7A). L'analisi di arricchimento genico ha fornito informazioni riguardo a numerose classi geniche arricchite, correlate alla “*synaptic transmission*” e al “*forebrain development*” (Fig. 1.7B). L'analisi di *sub-clustering* ha inoltre identificato trascritti arricchiti specifici per il differenziamento terminale, relativi alla funzione sinaptica, adesione cellulare o differenziamento striatale, come ad esempio *EBF1*, *ASCL1*, *GBX2* e *SOX5*, nuovamente validati *on-line* tramite il *database* Allen (Fig. 1.7C,D)

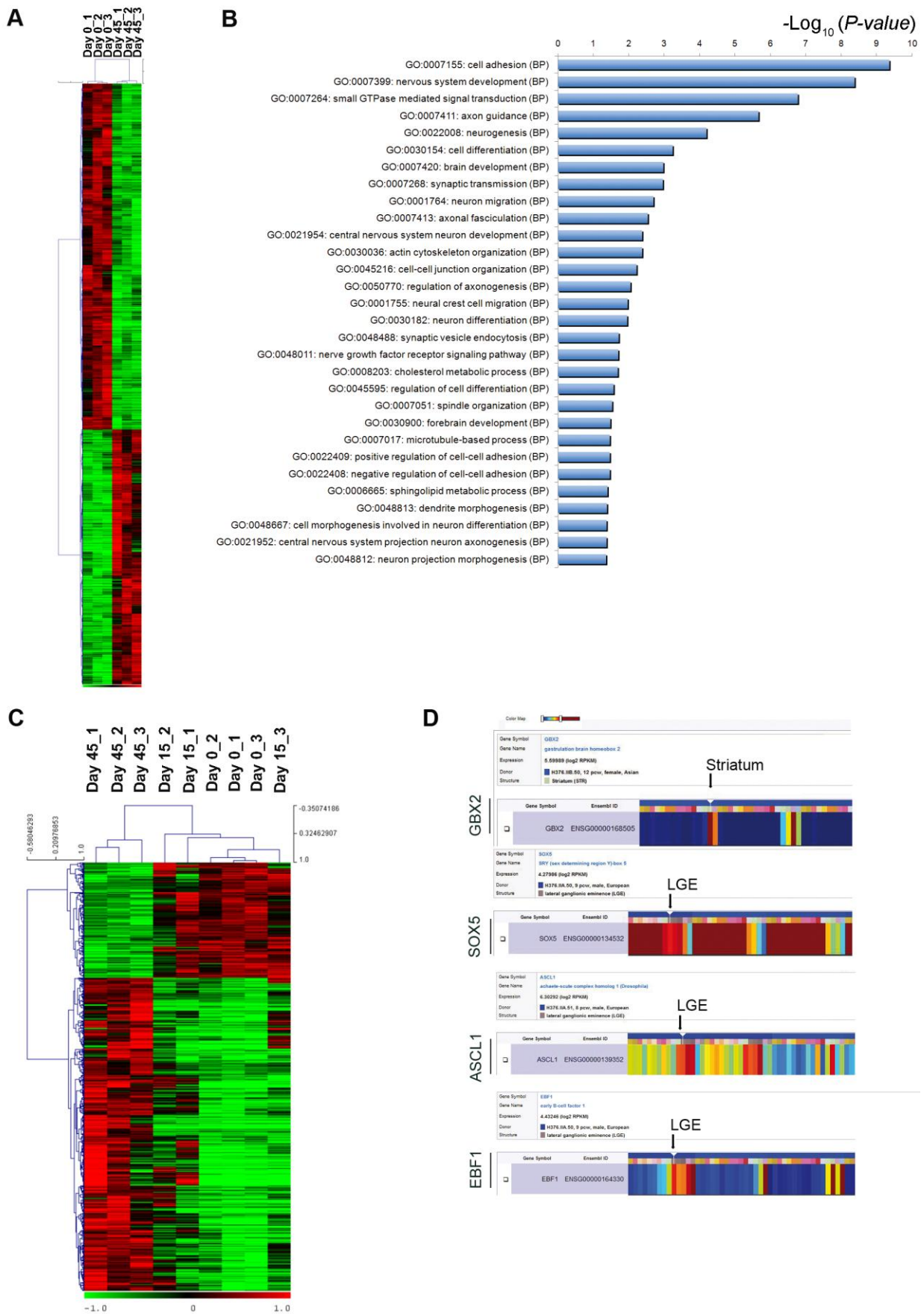


Fig.1.7. Profilo trascrizionale del giorno 45 del differenziamento ottenuto tramite analisi di *genome-wide gene expression*.

(A) Profilo trascrizionale delle cellule differenziate al giorno 45 *versus* il giorno 0. (B) Selezione delle classi geniche legate a funzioni neuronali, ottenute dall'analisi di arricchimento genico effettuata tramite *Genecodis tool*. (C) Analisi di *sub-clustering* del profilo trascrizionale del giorno 45. (D) Marcatori candidati come striatali-specifici presenti al giorno 45, derivati dall'analisi di *sub-clustering* e validati tramite Allen database <http://human.brain-map.org>.

Globalmente, le informazioni ottenute dall'analisi antigenica e trascrizionale ci suggeriscono che le cellule hanno differenziato terminalmente verso il fenotipo neuronale appropriato rispetto ai segnali indotti.

1.3 I MSNs generati acquisiscono una maturazione completa dopo 80 giorni di differenziamento

Durante la fase di differenziamento terminale le cellule vengono lasciate differenziare fino al giorno 80, stadio in cui vengono poi analizzate antigenicamente e funzionalmente.

Se si considera l'intero *time-course* del differenziamento, è particolarmente interessante analizzare l'andamento di alcuni geni chiave del differenziamento striatale. Dopo l'espressione precoce di *FOXG1*, i precursori striatali post-mitotici iniziano ad esprimere *ISL1*, il quale poi non viene più espresso negli MSNs ma solo in una popolazione di interneuroni (Wang and Liu, 2001). Analisi di RT-qPCR hanno confermato come l'espressione di *FOXG1*, che inizia al giorno 15 e persiste durante tutto il differenziamento, raggiunga il picco di espressione al giorno 60 (Fig. 8A). Invece *ISL1* raggiunge il picco al giorno 45 e poi inizia a diminuire (Fig. 1.8B). Per quanto riguarda marcatori specifici di MSNs, l'espressione di *ARPP-21* e *DARPP-32* è stata riscontrata al giorno 45 ed è stata mantenuta per tutto il *time-course* (Fig. 1.8C,D).

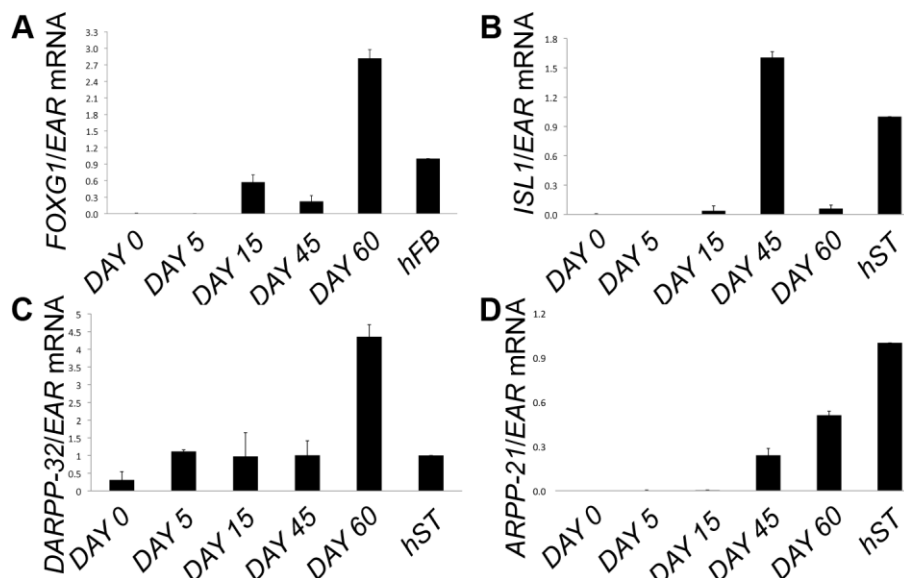


Fig. 1.8. Analisi temporale dei marcatori chiave del differenziamento telencefalico e striatale

Analisi tramite RT-qPCR per (A) *FOXG1*, (B) *ISL1*, (C) *DARPP-32*, (D) *ARPP-21*. Le colonne rappresentano la media di tre esperimenti \pm SD. I dati sono stati normalizzati su mRNA di *EAR*. Sono stati usati come controllo RNA derivato da striato fetale umano (hST) o da cervello fetale totale (hFB).

Complessivamente questi dati confermano l'avvenuta transizione verso il fenotipo di neurone maturo con un profilo temporale comparabile a quello normalmente osservato *in vivo*.

Alla fine del processo di differenziamento è stata effettuata una caratterizzazione antigenica approfondita, in modo da identificare le diverse popolazioni presenti nella cultura neurale. Al giorno 80 si riscontrano estese reti neuronali β III-tubulina positive, e il 51% delle cellule totali è positivo per MAP2ab (Fig. 1.9A,M). Il 17% delle cellule esprimente β III-tubulina è doppiamente positivo per nestin, suggerendo un'identità neuronale ancora precoce e soltanto il 7% delle cellule totali è puramente nestin⁺ (Fig. 1.9C,M). Conformemente a quanto accade *in vivo*, il programma astrogligenico si è attivato tardivamente rispetto a quello neuronale, in quanto cellule GFAP⁺ sono visibili solo al giorno 80 (Fig. 1.9D,M). Considerando i neuroni MAP2⁺, il 78% di questi co-esprime GABA, il 60.3% CTIP2 (l'86% dei quali co-esprime GABA, escludendo in questo modo un fenotipo corticale) e il 53% calbindina (Fig. 1.9A,E,F,M). E' stato osservato che il 70% dei neuroni CALB1⁺ co-esprime CTIP2, escludendo un'identità interneuronale e confermando quella di MSNs (Fig. 1.9G,M). Circa il 20% dei neuroni è DARPP-32⁺. L'identità di MSNs è stata ulteriormente confermata da analisi di microscopia confocale che hanno evidenziato la doppia positività per DARPP-32 e CTIP2 (Fig. 1.9H-M).

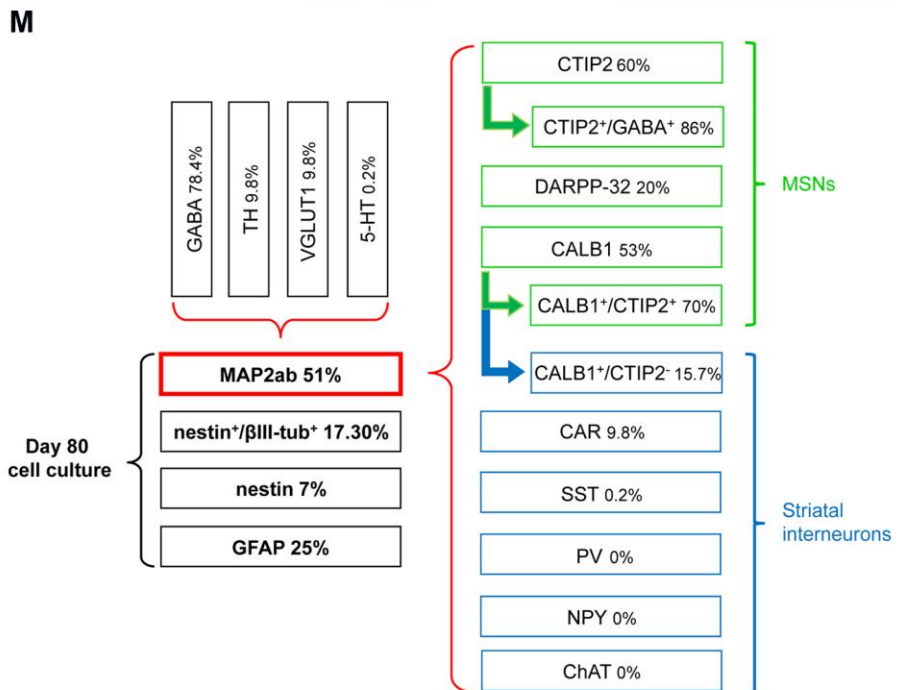
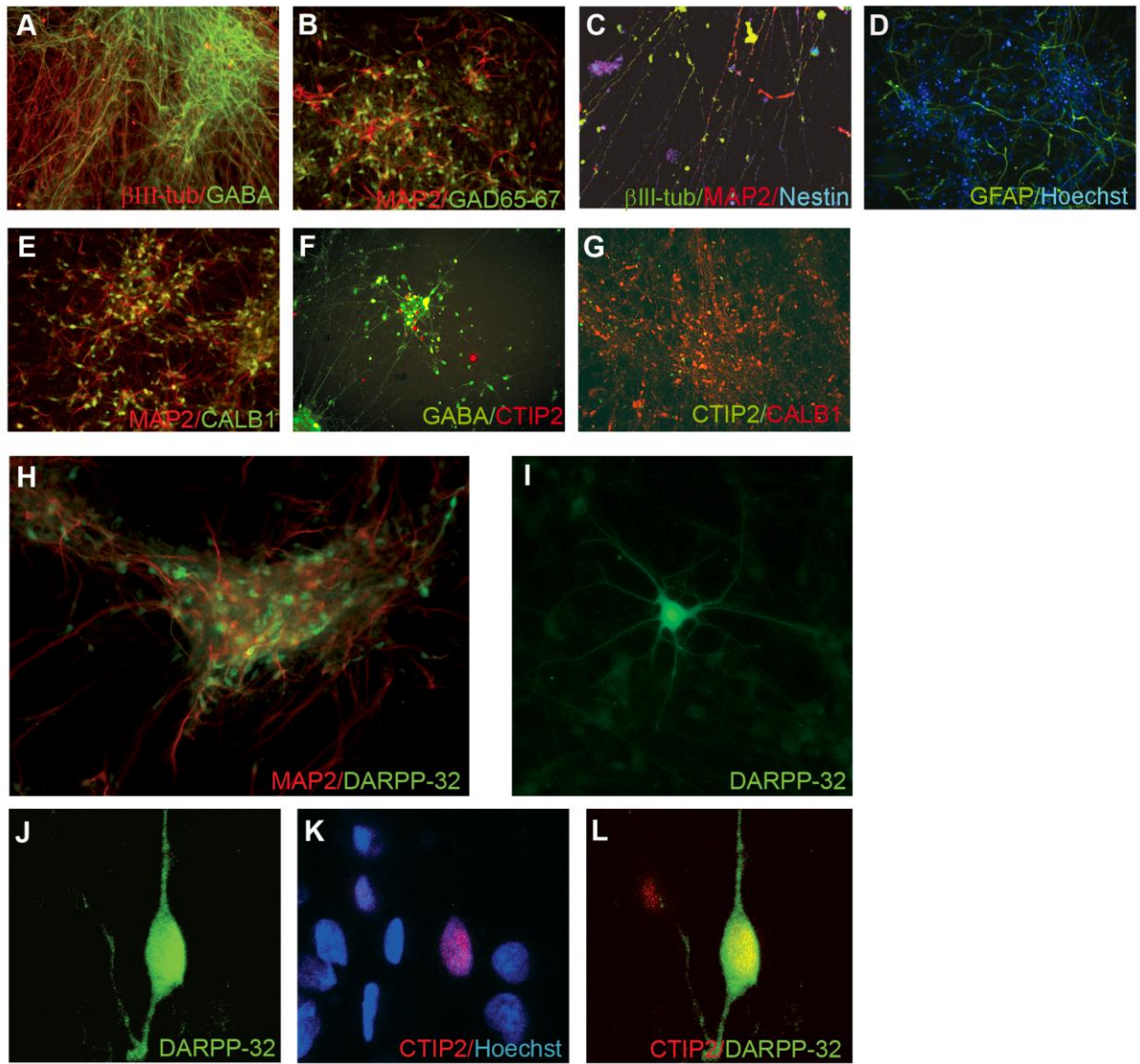


Fig. 1.9. Alla fine del differenziamento terminale il protocollo basato sull'esposizione a SHH/DKK-1 permette la generazione di neuroni maturi con fenotipo di MSNs.

(A-B) I neuroni maturi hanno un'identità GABAergica dopo 80 giorni di differenziamento (ingrandimento 20X). (C) Immunofluorescenza per β III-tubulin/nestin/MAP2ab e (D) GFAP. (E) Immunofluorescenza per calbindina, (F) co-espressione di GABA/CTIP2 e (G) CALB1/CTIP2. (H) Neuroni DARPP-32⁺ sono presenti, dopo 80 giorni di differenziamento. (I) Ingrandimento 40X che mostra la tipica morfologia di un neurone DARPP-32⁺. (J-L) Immagine acquisita al microscopio confocale che mostra la co-espressione di CTIP2 e DARPP-32 in un MSN (ingrandimento 40X). (M) Rappresentazione schematica delle diverse popolazione neuronali presenti dopo 80 giorni di differenziamento (MAP2⁺ 51±3%, *n* = 1126 cellule; GFAP⁺ 25±0,03%, *n* = 712 cellule; nestin⁺/βIII-tubulin⁺ 17.3±5.03%, *n* = 208 cellule; nestin⁺ 7±4.9%, *n* = 220 cellule; GABA⁺ 78.4±9.8%, *n* = 1242 cellule; TH⁺ 9.8±0.98%, *n* = 826 cellule; VGLUT1⁺ 9.8 0.6%, *n* = 1005 cellule; 5-HT⁺ 0.2±0.02%, *n* = 775 cellule; CTIP2⁺ 60.3±14.1%, *n* = 320 cellule; CTIP2⁺/GABA⁺ 86±7.6%, *n* = 320 cellule; CALB1⁺ 53 ±5%, *n* = 1020 cellule; CALB1⁺/CTIP2⁺ 70.6±19.5%, *n* = 770 cellule; DARPP-32⁺ 20±3.9%, *n* = 987 cellule; CALB1⁺/CTIP2⁻ 29.4±19.5%, *n* = 770 cellule; CR⁺ 9.8±3.9%, *n* = 956 cellule; SST⁺ 0.2±0.02%, *n* = 810 cellule; PVALB⁺ 0%, *n* = 790 cellule; NPY⁺ and ChAT 0%, *n* = 680 cellule) (media ± SD).

Analoghi risultati sono stati ottenuti dal differenziamento delle altre linee di cellule staminali pluripotenti testate. Le hES HS401 hanno generato in un tempo e con efficienza comparabile con le cellule H9 neuroni FOXP2 e DARPP-32 positivi (Fig. 1.10A-C,J). In modo assolutamente simile, anche le cellule hiPS hanno differenziato verso neuroni GABAergici e verso MSNs DARPP-32⁺/CTIP2⁺ (Fig. 1.10D-I,J).

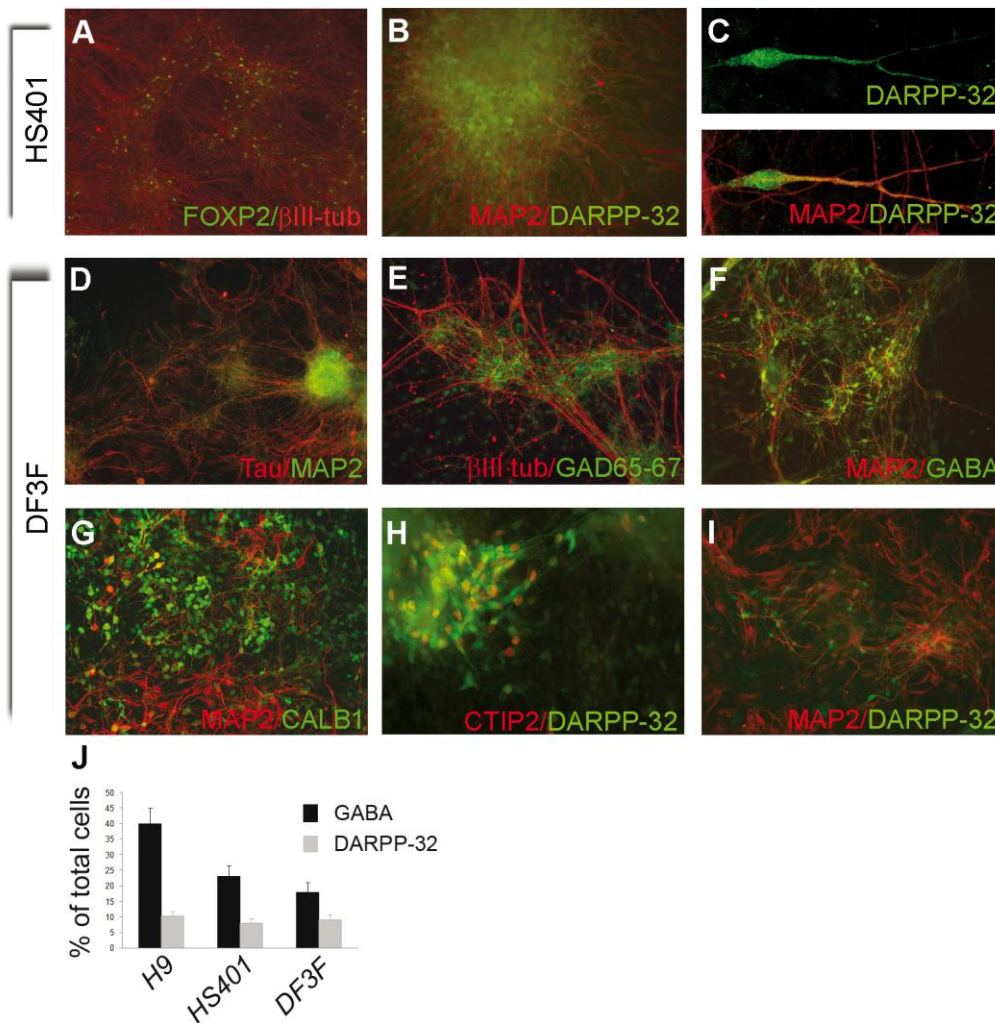


Fig. 1.10. Le cellule HS401 e la linea di cellule hiPS DF3F differenziano verso neuroni striatali con efficienza comparabile alla linea cellulare H9.

(A) Immunofluorescenza per FOXP2 su neuroni al giorno 45 di differenziamento ottenuti da cellule HS401. (B) Alla fine del differenziamento $8.1 \pm 1\%$ delle cellule esprime DARPP-32 ($n = 1820$ cellule) (ingrandimento 20X). (C) Immagine confocale di cellule DARPP-32⁺ (ingrandimento 40X). (D) Neuroni terminalmente differenziati derivati dalla linea cellulare DF3F esprimono i marcatori pan-neuronali MAP2ab e TAU, e GABAergici (E) GAD65/67, (F) GABA, (G) calbindina (CALB1), e i marcatori striatali (H) CTIP2 e (I) DARPP-32. (J) Istogramma rappresentativo della comparazione di efficienza di differenziamento (cellule GABA e DARPP-32 positive) tra le tre linee analizzate (HS401: GABA $23 \pm 3\%$, $n = 2226$ cellule; DARPP-32, $8.1 \pm 1\%$, $n = 1820$ cellule. DF3F: GABA $17.8 \pm 3\%$, $n = 1153$ cellule; DARPP-32, $9.1 \pm 1.6\%$, $n = 2145$ cellule) (media \pm DS).

Questi dati dimostrano come il protocollo sia efficacemente riproducibile su diverse linee cellulari di cellule hES e hiPS.

Dalle eminenze telencefaliche si originano anche le popolazioni di interneuroni, la maggior parte delle quali ha identità GABAergica mentre solo una piccola percentuale è colinergica. Queste si

distinguono tra loro sulla base delle diverse positività per alcuni marcatori: calretinina (CR), parvalbumina (PVALB), somatostatina (SST), neuropeptide Y (NPY), e ossido nitrico sintasi (NOS). Per quanto riguarda la componente di interneuroni presente nelle colture cellulari ottenute dopo 80 giorni di differenziamento, il 15.7% delle cellule è CALB1⁺/CTIP2⁻ (Fig. 1.9G,M), e il 9.8% delle cellule è CR⁺ (Fig. 1.11A e 1.9M). Sono state rilevate sporadicamente cellule positive per la somatostatina (Fig. 1.11B e 1.9M), nessuna cellula è risultata positiva per NPY, PVALB (Fig. 1.11A,B e 1.9M) e colina acetiltransferasi (ChAT) (non mostrato). Per verificare la specificità del protocollo è stata verificata la presenza di altri tipi neurali non striatali, ma sono state osservate cellule positive per la 5-idrossitriptamina (5-HT), per la tirosina idrossilasi (TH) e per *vesicular glutamate transporter 1* (VGLUT1) in una percentuale trascurabile rispetto al fenotipo GABAergico presente (Fig. 1.11C,D e Fig. 1.9M).

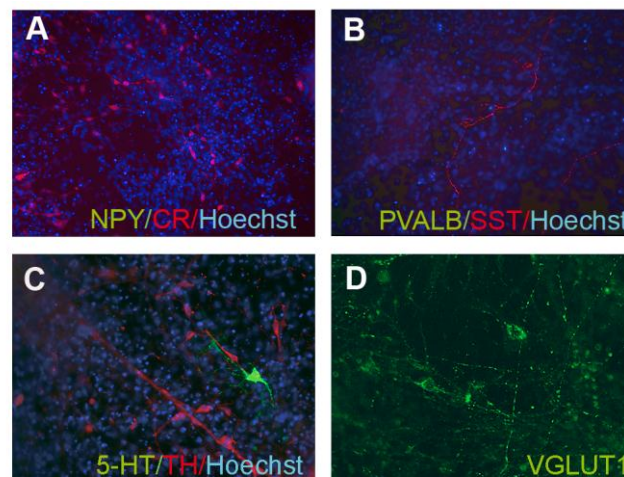


Fig. 1.11. Analisi di sottotipi neuronali non striatali.

(A) L'analisi del fenotipo interneuronale al giorno 80 mostra positività per (A) calretinina (CR), e parvalbumina (B) (PVALB), mentre non sono state riscontrate cellule positive per (A) il neuropeptide Y (NPY) e per la (B) somatostatina (SST). (C) Neuroni positivi per Tirosina idrossilasi (TH) e 5-idrossitriptamina (5-HT) al giorno 80. (D) Immunocitochimica per VGLUT1.

Successivamente, è stato verificato che i neuroni generati possedessero le corrette caratteristiche neurochimiche e molecolari, tipiche dei MSNs maturi. A seconda dei recettori dopaminergici che vengono espressi, gli MSNs formano la via diretta e indiretta nel sistema dei gangli della base (Kreitzer, 2009). Tramite RT-qPCR è stata osservata la presenza del trascritto del recettore 1 della dopamina (*DrD1*) a partire dal giorno 45 (Fig. 1.12A), mentre tramite immunofluorescenza è stata rilevata la presenza del DrD2 nei neuroni β III-tubulin⁺ e più specificamente in MSNs CTIP2⁺ (Fig. 1.12B,C). E' stata trovata anche l'espressione del recettore dell'adenosina 2a (A2a) (Fig. 1.12D).

Questi dati dimostrano l'acquisizione da parte dei MSNs generati di un fenotipo neurochimico e molecolare tipico dei MSNs presenti *in vivo*.

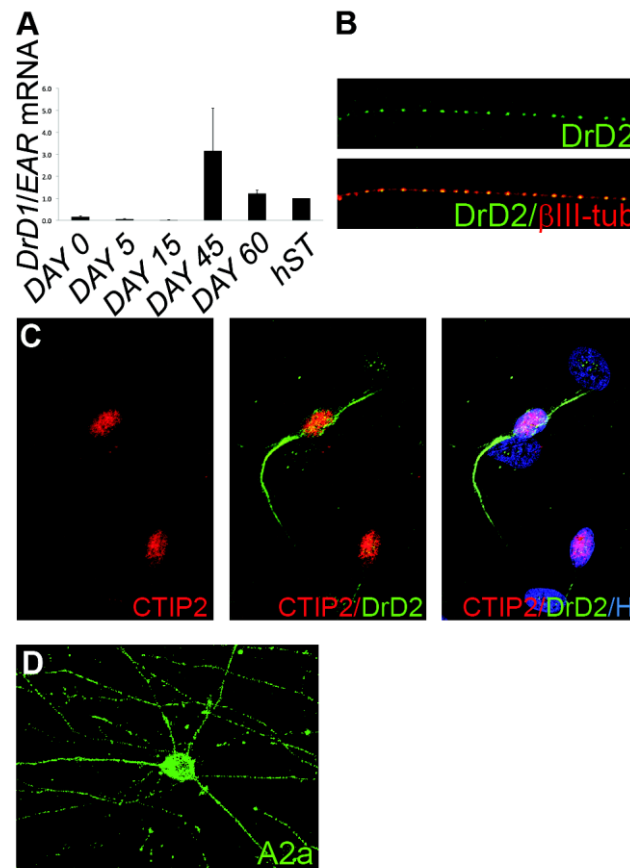


Fig. 1.12. Analisi antigenica e molecolare delle cellule differenziate terminalmente.

(A) RT-qPCR per DrD1. Le colonne rappresentano la media di tre esperimenti \pm SD. I dati sono stati normalizzati su mRNA di *EAR*. Sono stati usati come controlli positivi RNA derivato da striato fetale umano (hST) o da cervello fetale totale (hFB). (B) Immagine acquisita al microscopio confocale per DrD2 con β III-tubulina e (C) CTIP2. (D) Immagine confocale per il recettore A2a al giorno 80 (ingrandimento 40X).

1.4 La popolazione neuronale generata presenta correnti sodio, potenziali d'azione e recettori GABA funzionali

Una proprietà distintiva di neuroni maturi è la loro capacità di acquisire diverse proprietà elettrofisiologiche.

L'analisi di *sub-clustering* effettuata al giorno 45 del differenziamento ha evidenziato un arricchimento nei trascritti codificanti per diversi canali ionici voltaggio-dipendenti, come ad esempio quelli per le subunità α - e β del canale Na^+ , suggerendo la potenziale capacità di queste cellule di generare potenziali d'azione. È di particolare interesse l'incremento di espressione di 6 volte del trascritto codificante per Nav1.2, subunità α del canale Na^+ implicato nell'inizio e nella

persistenza dei potenziali d'azione, nonché nel mantenimento di scariche ripetitive (Fig. 1.7C). Le caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni generati sono state valutate tramite le tecniche del *whole-cell patch-clamp* sia in *voltage-clamp* che in *current-clamp*, e l'intera analisi è stata effettuata in collaborazione con il gruppo del Prof. Biella dell'Università di Pavia. Il 13% dei neuroni registrati non ha mostrato nessun segno di evento rigenerativo dopo la stimolazione con corrente depolarizzante soprasoglia, il 30% ha originato un singolo potenziale d'azione e il 57% ha mostrato scariche ripetitive, come mostrato in figura 1.13A (media in Fig. 1.13D). In parallelo, come atteso, è stata trovata una correlazione tra la capacità di queste cellule di originare potenziali d'azione e l'attivazione di correnti Na^+ e K^+ , come mostrato in figura 1.13B. Dopo l'analisi dei potenziali d'azione e delle correnti, i neuroni registrati iniettati con la biocitina sono stati marcati con DARPP-32, per verificare che le tracce registrate provenissero dai MSNs generati. Un'immagine rappresentativa è riportata in figura 1.13C (le tracce relative sono rappresentate in figura 1.13A,B). Circa nel 19% delle cellule registrate, l'ampiezza delle correnti Na^+ era irrilevante, nel 26% delle cellule il picco di ampiezza di corrente era in un intervallo tra 0 e 400pA, nel 55% delle cellule era maggiore di 400pA (Fig. 1.13E). Inoltre, tra i neuroni in grado di sostenere potenziali d'azione ripetuti, durante l'iniezione di corrente soprasoglia, l'85% di questi (11 su 13) ha mostrato una lenta depolarizzazione ed un ritardo nel generare il primo potenziale d'azione (Fig. 1.13F), come è stato descritto in MSNs di ratto (Nisenbaum et al., 1996; Shen et al., 2004; Surmeier et al., 1989; Surmeier et al., 1991). Questo comportamento peculiare suggerisce che, nella frazione di cellule che mostra un ritardo nella generazione del primo potenziale d'azione, potrebbe essere indotta una corrente K^+ rapida inattivante, le cui proprietà ricordano quelle della corrente I_A . I_A è coinvolta anche nel regolare la frequenza dei potenziali d'azione e il periodo di latenza del primo potenziale (Ericsson et al., 2011; Jiang and North, 1991), ed è una caratteristica peculiare degli MSNs.

L'acquisizione di un fenotipo neuronale funzionale maturo implica la capacità di sviluppare una rete sinaptica funzionale. Per questo motivo, ci siamo chiesti se i canali espressi fossero in grado di attivarsi tramite l'applicazione di neurotrasmettitori inibitori o eccitatori. Applicando GABA alla coltura e mantenendo un potenziale di membrana di -80mV, nel 74% delle cellule registrate si sono osservate correnti GABA-indotte, con una ampiezza media di 357 ± 160 pA. Considerando che le analisi di RT-qPCR e di immunofluorescenza hanno indicato la presenza di recettori dopaminergici, è stato investigato se fosse possibile modulare le correnti GABA tramite l'aggiunta di dopamina. In tre su cinque cellule analizzate, la dopamina ha significativamente, e in modo parzialmente reversibile, ridotto il picco delle correnti GABA-indotte del 27 ± 10 % (Fig. 1.13G).

L'eccitabilità neuronale e la funzionalità delle reti sinaptiche generate in coltura, possono essere validate anche tramite l'analisi delle correnti spontanee post-sinaptiche (sPSCs). Dal momento che i

neuroni analizzati hanno mostrato un potenziale a riposo depolarizzante e non sono stati registrati potenziali d'azione spontanei a riposo, ci si aspetta di osservare correnti GABAergiche spontanee ad una frequenza molto bassa. In effetti, in tre neuroni sono state registrate sPSCs GABAergiche a bassa frequenza con un'ampiezza media di 61 ± 16 pA (Fig. 1.13H), mentre non sono state riscontrate sPSCs glutamatergiche. La presenza di sinapsi mature è stata anche dimostrata dall'analisi confocale per la sinaptofisina (Fig. 1.13I).

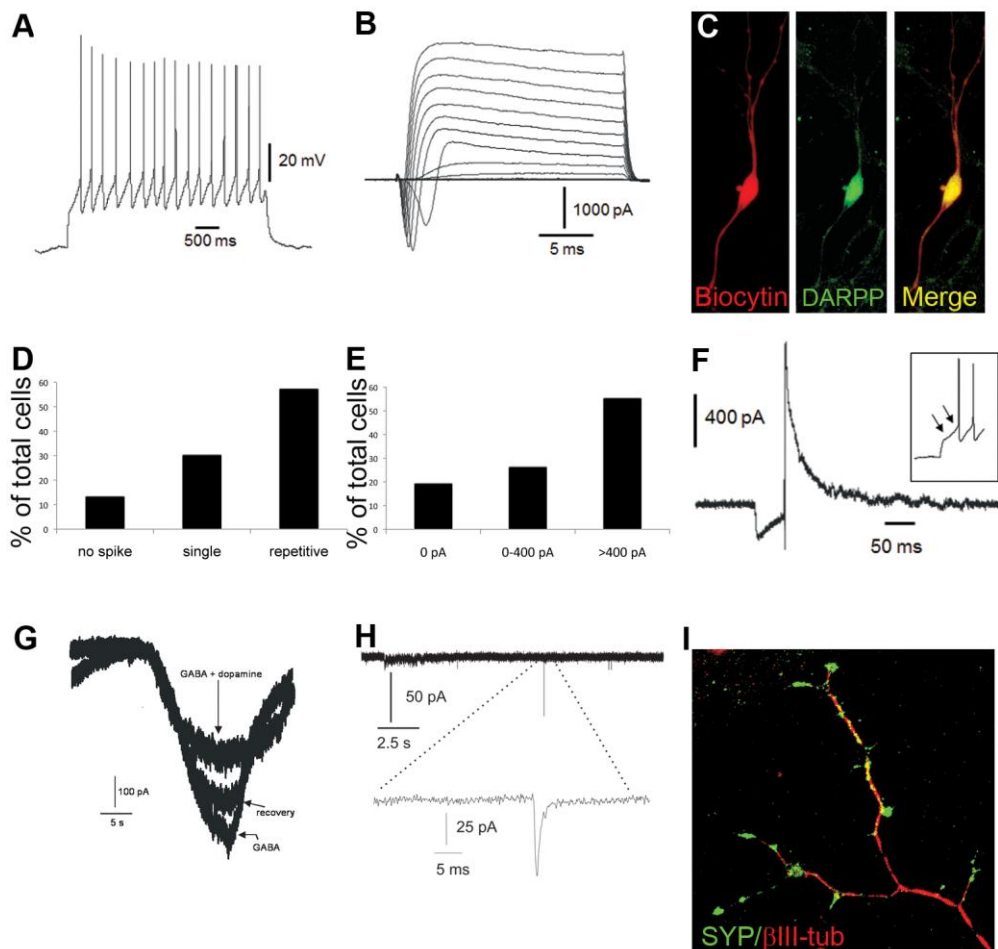


Fig. 1.13. Proprietà elettrofisiologiche dei neuroni terminalmente differenziati.

(A) Traccia rappresentativa di potenziali d'azione ripetitivi registrati in un neurone al giorno 87 di differenziamento, dopo eccitazione con corrente depolarizzante soprasoglia. (B) Famiglia di correnti totali entranti e uscenti. (C) Immagine acquisita al confocale di un neurone registrato, iniettato con la biocitina e positivo per DARPP-32. (D) Istogramma rappresentativo della popolazione cellulare registrata, suddivisa in base alla capacità di generare potenziale d'azione (assenza di potenziali: 13%, $n = 3$ cellule; singolo potenziale: 30%, $n = 7$ cellule; potenziali ripetuti: 57%, $n = 13$ cellule). (E) Istogramma rappresentativo della popolazione registrata, suddivisa in base all'ampiezza del picco di corrente Na^+ registrato: 0 pA: 19%, $n = 11$ cellule; <400 pA (media \pm s.e.m. -218 ± 25.00 pA): 26%, $n = 15$ cellule; >400 pA (-1750 ± 250 pA): 55%, $n = 32$ cellule. (F) Una parte delle cellule (23%, $n = 11$ cellule) mostra la corrente K^+ a rapida inattivazione, le cui proprietà ricordano quelle della corrente I_A . (G) L'applicazione locale di GABA nel 74% dei neuroni

registrati, mantenendo il potenziale di membrana a -80 mV, porta alla formazione di corrente entrante con un picco medio di ampiezza di 357 ± 160 pA. In una frazione di cellule ($27 \pm 10\%$), l'ampiezza è significativamente ridotta dalla co-applicazione locale di dopamina. Questo effetto è parzialmente reversibile. (H) Correnti GABAergiche post-sinaptiche spontanee (sPSCs) registrate in 3 cellule (ampiezza media 61 ± 16 pA). (I) Immagine acquisita al microscopio confocale per la sinaptofisina (SYP) con β III-tubulina.

Sono state analizzate anche neuroni derivati da cellule hiPS. Come mostrato in figura 1.14A e G, il 12% delle cellule registrate non mostra correnti Na^+ , il 33% ha generato correnti con un picco tra 0 e 400pA e il 55% mostra correnti con un picco superiore a 400pA (Fig. 1.14G). Durante la depolarizzazione soprasoglia, il 22% delle cellule non ha mostrato alcun evento rigenerativo, il 39% ha generato un singolo potenziale d'azione e il 39% potenziali d'azione ripetitivi (Fig. 1.14B,H). L'applicazione del quinpirolo, agonista selettivo per il recettore DrD2, ha indotto iperpolarizzazione del potenziale di membrana in due cellule su quattro, evento consistente con la modulazione dei canali K^+ mediata dal DrD2, come atteso dall'attivazione mediata, dal DrD2, dei canali GIRK. Durante l'applicazione del quinpirolo, mantenendo il potenziale di membrana a -70 mV, è stato misurato un cambiamento reversibile di -5.6 ± 1.8 mV (Fig. 1.14C). Anche i neuroni derivati da cellule hiPS e registrati sono stati post-marcati con la biocitina e CTIP2, per verificare che le tracce rilevate fossero specifiche di MSNs (Fig. 1.14D-F).

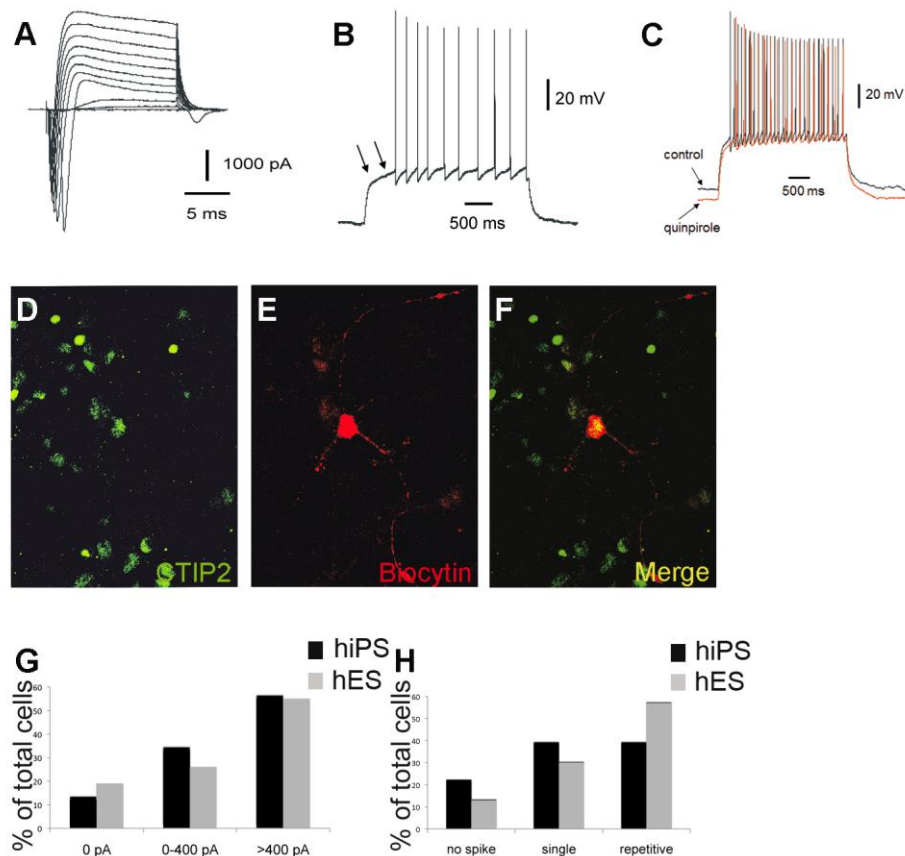


Fig. 1.14. Proprietà elettrofisiologiche di neuroni terminalmente differenziati a partire da cellule hiPS.

(A) Famiglia di correnti totali entranti e uscenti indotte ad un potenziale di membrana compreso tra -70 e +40 mV con un voltaggio mantenuto a -90 mV. (B) Traccia rappresentativa ottenuta in configurazione di *current-clamp*, registrata da un neurone al giorno 73 di differenziamento, che mostra potenziali d'azione ripetitivi, dopo eccitazione con corrente depolarizzante soprasoglia. Si evince, inoltre, un ritardo nella generazione del primo potenziale d'azione (vedere le frecce), una tipica proprietà elettrofisiologica di MSNs maturi. (C) L'applicazione del quinpirolo (5 μ M), agonista del DrD2, ha indotto iperpolarizzazione del potenziale di membrana in 2 delle 4 cellule analizzate. (D-F) Immagine confocale di un neurone registrato iniettato con la biocitina e post-marcato per CTIP2 (ingrandimento 40X). (G) Istogramma rappresentativo della frazione di cellule registrate (derivate da cellule hiPS e hES), suddivise in tre gruppi, in accordo con l'ampiezza del picco di corrente Na^+ . hiPS: 0 pA: 12% ($n = 2$ cellule); <400 pA (media 315 ± 25 s.e.m.): 33% ($n = 6$ cellule) ; >400 pA (media -1746 ± 481 s.e.m.): 55% ($n = 10$ cellule). hES: 0 pA: 19%, $n = 11$ cellule; <400 pA (media \pm s.e.m. -218 ± 25.00 pA): 26%, $n = 15$ cellule; >400 pA (-1750 ± 250 pA): 55%, $n = 32$ cellule. (H) Istogramma rappresentativo della frazione di cellule registrate (derivate da cellule hiPS e hES) suddivise in tre gruppi in accordo con le loro capacità di generare potenziali d'azione, hiPS: no potenziali d'azione: 22% $n = 4$ cellule; singolo potenziale: 39% $n = 7$ cellule; potenziali ripetuti: 39% $n = 7$ cellule). Neuroni da cellule hES: (no potenziale: 13%, $n = 3$ cellule; singolo potenziale: 30%, $n = 7$ cellule; potenziali ripetuti: 57%, $n = 13$ cellule).

Questi dati ci permettono di affermare che una larga parte di MSNs derivati sia da cellule hES che da hiPS sono in grado di generare potenziali d'azione singoli e ripetuti, di strutturare reti sinaptiche GABAergiche funzionali sensibili alla stimolazione indotta dal GABA e dalla dopamina, e mostrano inoltre attività GABAergica spontanea post-sinaptica ad una bassa frequenza.

1.5 Precursori striatali derivati da cellule pluripotenti, trapiantati in modelli animali, sopravvivono e differenziano verso neuroni DARPP-32⁺

Dopo aver verificato la corretta maturazione antigenica e funzionale dei neuroni generati *in vitro*, abbiamo deciso di studiare il loro potenziale differenziativo, dopo trapianto in modello animale. Come modello animale è stato scelto di utilizzare il ratto adulto lesionato con acido chinolinico, la cui azione porta alla completa distruzione dei neuroni DARPP-32⁺. In collaborazione con il gruppo di Stephen Dunnett dell'Università di Cardiff, sono state trapiantate nello striato 5×10^5 cellule al giorno 38 di differenziamento (Fig. 1.15A,B). I ratti sono stati sacrificati dopo 3, 6, e 9 settimane dal trapianto. Analisi di immunostochimica hanno rivelato una buona sopravvivenza delle cellule trapiantate nel tessuto ospite a tutti i *time-points* analizzati (Fig. 1.15C-E). Successivamente ci si è focalizzati sull'analisi dell'identità regionale dei progenitori trapiantati. Dopo 6 settimane dal trapianto, i progenitori non esprimono SOX1 (Fig. 1.15F), ma esprimono correttamente OTX2 e FOXG1, indice del corretto mantenimento, *in vivo*, dell'identità regionale acquisita *in vitro* (Fig. 1.15G,H). In tutti i *time-points* analizzati non sono state mai osservate cellule OCT4⁺, né sono stati osservati segni di teratoma, anche se alcune cellule hanno mantenuto capacità proliferative, come indicato dalla positività per Ki67, che comunque è diminuita lungo il *time-course* (a 3 settimane: $56.38\% \pm 7.72$; a 9 settimane: $22.55\% \pm 3.02$ delle cellule hnuclei⁺, n=3 cervelli/*time point*). A partire da 6 settimane dopo il trapianto, è stata osservata la presenza di campi densi di cellule MAP2ab e β III-tubulina positivi (Fig. 1.15I,J). Mentre a tre settimane post-trapianto non è stato osservato nessun marcatore striatale, a 9 settimane sono evidenti cellule FOXP1 e FOXP2 positive (Fig. 1.15K,L). E' stata osservata anche la presenza di DARPP-32, attribuita alle cellule trapiantate in quanto doppiamente espresso con hNuclei (Fig. 1.15M,N). Questo risultato dimostra come le cellule trapiantate siano in grado di sopravvivere e maturare verso il destino di MSN *in vivo*. Inoltre, la presenza di fibre nestin⁺ che proiettano verso il tessuto striatale intatto, suggerisce una possibile integrazione del trapianto nel tessuto ospite (Fig. 1.15O).

Dimostrato che le cellule trapiantate sopravvivono e differenziano, successivamente abbiamo investigato se queste fossero in grado di indurre un miglioramento funzionale all'animale. I ratti trapiantati, comparati con animali lesionati e non trapiantati (coorte controllo), hanno mostrato una

chiara riduzione nelle rotazioni indotte da apomorfina, un test motorio normalmente utilizzato per questo tipo di modello animale. La riduzione nel numero di rotazioni effettuate dai ratti trapiantati è risultata evidente già dopo 3 settimane dal trapianto, quando i ratti trapiantati hanno ridotto le rotazioni di almeno 200 rotazioni, arrivando a meno di 100 rotazioni per ogni sessione da 60 minuti (Fig. 1.15P).

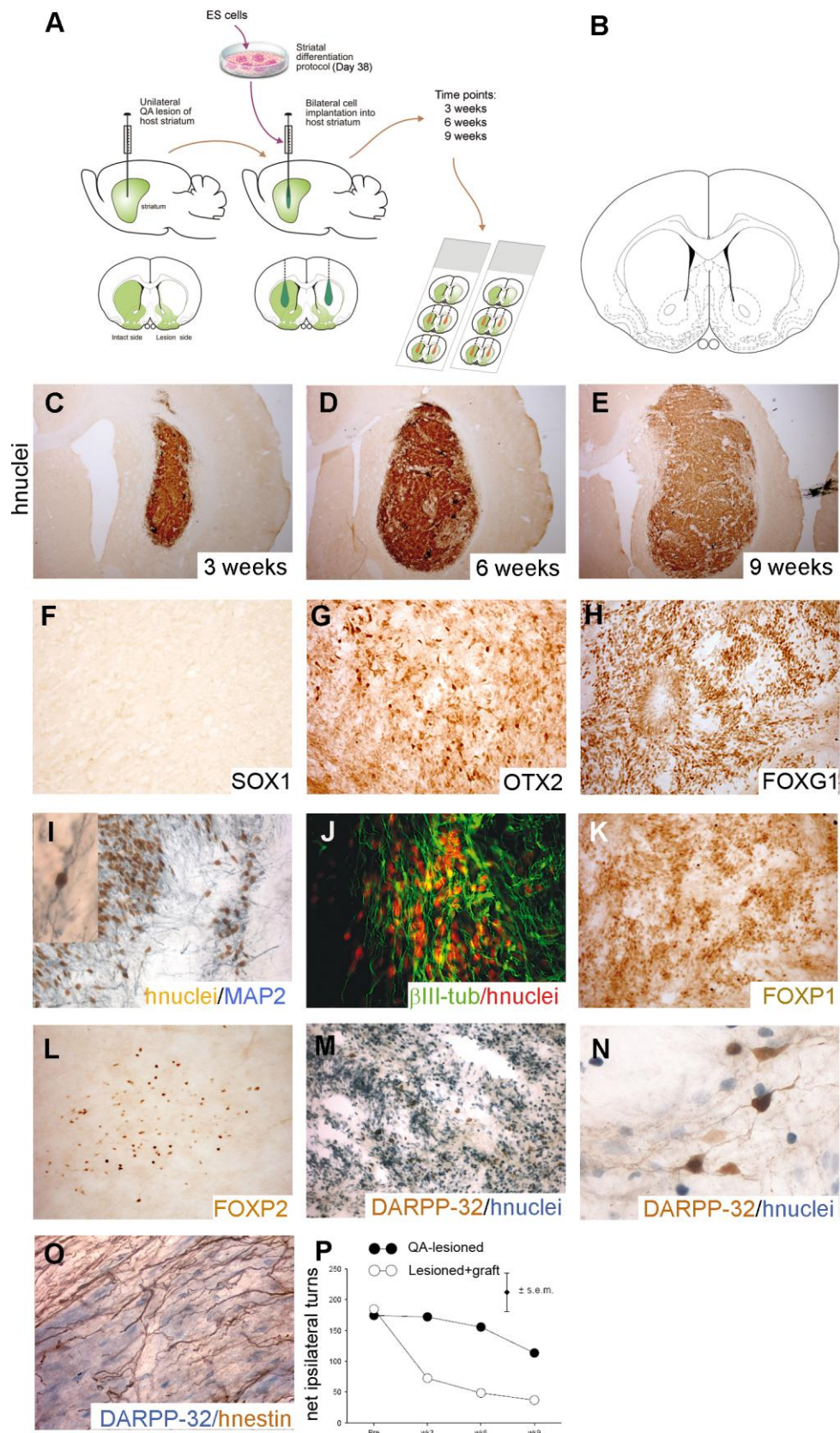


Fig. 1.15. I progenitori striatali generati *in vitro* sopravvivono e differenziano dopo trapianto in modello animale.

(A) Rappresentazione schematica del protocollo di trapianto. (B) Sezione coronale dello striato di ratto

(+0.70 mm dal bregma) dal Paxinos e Watson (Paxinos, 1986). (C-E) Immagini delle cellule trapiantate marcate con hNuclei nello striato di ratto, 3-6-9 settimane dopo il trapianto (ingrandimento 1.6X). (F,H,I) Marcatura per MAP2ab, FOXP1, FOXP2, e (G) doppio *staining* per hNuclei e β III-tubulina (ingrandimento 40X). (J,K) Marcatura per DARPP-32 dopo 9 settimane dal trapianto (human nuclei in blu, DARPP-32 in marrone) (ingrandimento 20X e 40X). Media di neuroni DARPP-32+/trapianto = 2145.6 ± 151.05 , media \pm SD, cellule human nuclei⁺ = 4×10^6 /trapianto. (L) Test delle rotazioni indotte da apomorfina a 3-6-9 settimane dopo il trapianto. I dati sono stati analizzati tramite l'analisi ANOVA a due fattori con test per misure ripetute. L'effetto del test X sui gruppi è significativo, $F(3,42) = 6.34$, $p < 0.001$, e la comparazione tramite il test Sidak tra i due gruppi, a ciascuno dei 4 *time points*, non ha indicato differenze tra i gruppi nel test pre-trapianto, $t(29) = 0.25$, n.s., è significativo a 3 e 6 settimane post-trapianto; 3 settimane, $t = 2.43$; 6 settimane, $t = 2.60$, entrambi $p < 0.05$; e perde significidi 9 settimane, $t = 1.96$, $P < 0.1$. ($n = 9$ ratti lesionati +trapiantati, 3 per ogni *time point*; animali solo lesionati $n = 13$ ratti).

L'importante questione inerente il trapianto di neuroni in cervello adulto riguarda la loro capacità di maturare funzionalmente integrandosi nell'animale ospite. Non è infatti noto quanto l'effetto migliorativo sia dovuto all'effettiva integrazione e capacità di ricostruzione dei nuovi neuroni. Progenitori GFP⁺ derivati da cellule hES sono stati trapiantati in feti di ratto all'età gestazionale E16, tramite iniezione *in utero*. A 20 giorni dalla nascita i ratti sono stati sacrificati e sono state effettuate registrazioni elettrofisiologiche su fettine P20-P30 (Fig. 1.16A). 2 delle 8 cellule registrate hanno mostrato un chiaro fenotipo di neuroni differenziati, mentre le altre hanno mostrato un differenziamento ancora parziale. Sui neuroni differenziati sono state registrate correnti Na⁺ con un'ampiezza media di 4684pA, nonché potenziali d'azione ripetitivi (Fig. 1.16B,C). Inoltre, la presenza di sinapsi funzionali e PSCs hanno confermato la corretta formazione di reti sinaptiche.

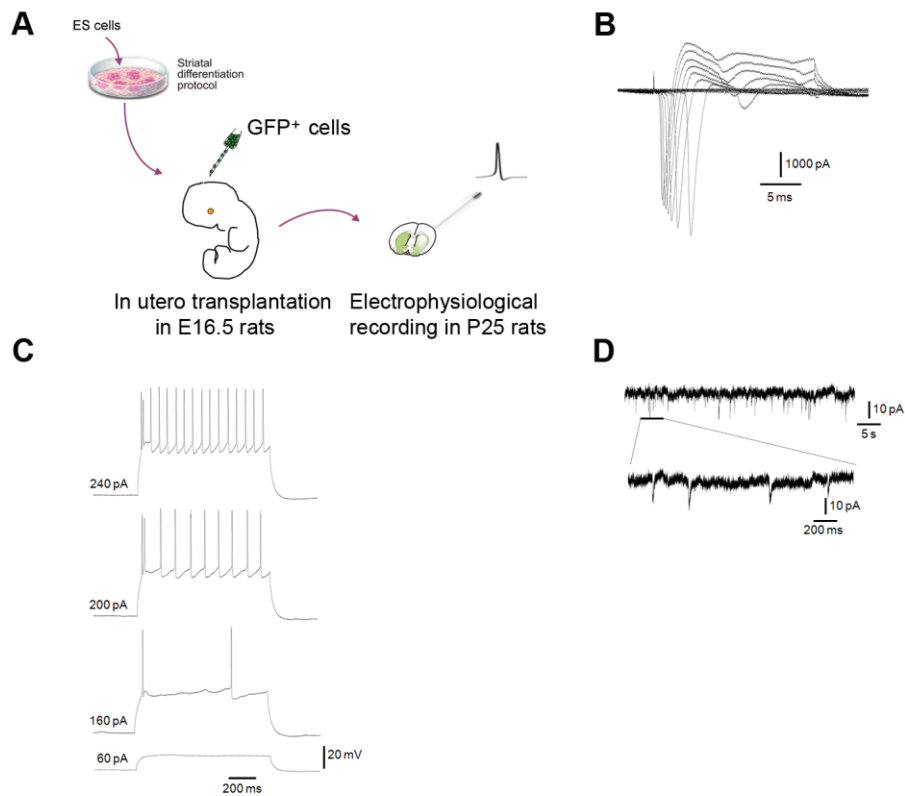


Fig. 1.16. I progenitori striatali trapiantati *in vivo* sono funzionalmente maturi.

(A) Schema del protocollo di trapianto in ratti all'età gestazionale E16.5. (B) Relazione corrente/voltaggio (I/V). (C) Famiglia di step di depolarizzazione sotto e soprasoglia dal potenziale di riposo di -73 mV indotto da iniezioni di correnti depolarizzanti. La grandezza dello stimolo è indicato sulla sinistra. Le cellule mostrano un'alta frequenza di potenziali d'azione e una successiva marcata iperpolarizzazione. (D) Correnti post-sinaptiche spontanee regitate in *voltage-clamp* al potenziale di riposo di -70 mV.

In conclusione, la caratterizzazione effettuata del differenziamento ci permette di affermare di aver sviluppato un protocollo che ricapitola *in vitro* le principali fasi dello sviluppo dello striato. Ciò permette di generare neuroni maturi con caratteristiche antigeniche e funzionali di MSNs, mai ottenuti fin'ora da cellule staminali, che sopravvivono dopo trapianto sia in cervello di ratto fetale che adulto, si integrano funzionalmente e sono in grado di migliorare i *deficit* motori nel modello di ratto HD.

2. Generazione di un modello malattia, attraverso la generazione di cellule iPS da pazienti affetti da HD

2.1 Generazione di cellule iPS da fibroblasti derivati da pazienti HD

Il protocollo di differenziamento diretto di cellule pluripotenti verso neuroni striatali descritto in questo lavoro di Tesi, rappresenta un valido strumento per la generazione *in vitro* di un modello per la malattia di Huntington. Per generare un modello cellulare, il più fedelmente possibile simile alla condizione patologica, è necessario ottenere, infatti, neuroni striatali da cellule portatrici della mutazione.

A questo scopo, in questo lavoro di Tesi sono state derivate diverse linee di cellule iPS umane a partire da linee cellulari di fibroblasti derivati da tre pazienti affetti da HD, denominati HD509, HD832, e HD1657, ottenuti grazie alla collaborazione con l'Istituto Neurologico "C. Besta" di Milano. Le prime due linee cellulari derivano da rari pazienti omozigoti per la mutazione, con un'espansione del tratto CAG rispettivamente di 42/44 CAG e 39/42 CAG. La linea cellulare eterozigote per la mutazione è invece 45/17. In parallelo, sono state derivate due diverse linee di cellule iPS da fibroblasti adulti *wild type* (WT) con 15/17 CAG e da fibroblasti neonatali WT con 15/18 CAG (Tabella 2.1).

Fibroblast lines	Haplotype ^a	Age	Reprogramming factors	iPS lines
HD509	42/44	59	OKSM ^b (lentivirus)	HD-iPS ^{hom} 4F-1
			OKSM (lentivirus)	HD-iPS ^{hom} 4F-2
			OKS (lentivirus)	HD-iPS ^{hom} 3F-1
			OKS (lentivirus)	HD-iPS ^{hom} 3F-2
HD832	39/43	44	OKSM (lentivirus)	HD-iPS ^{hom} 4F-3
HD1657	17/45	36	OKS (lentivirus)	HD-iPS ^{het} 3F-1
Dermal fibroblasts	15/17	36	OKS (retrovirus)	WT-iPS 3F-1
Foreskin fibroblasts	15/18	Newborn	OKSM (lentivirus)	WT-iPS 4F-1

^a L'aplotipo indica il numero delle ripetizioni del tratto CAG su ciascun allele

^bOKSM: *OCT4* (O), *KLF4* (K), *SOX2* (S), *C-MYC* (M)

Tabella 2.1. Linee cellulari di fibroblasti riprogrammati e nomenclatura dei cloni generati.

Come metodi di riprogrammazione sono stati utilizzati due diversi lentivirus policistronici. In un primo *round* di infezione, i fibroblasti sono stati trasdotti con un singolo vettore lentivirale policistronico codificante per i quattro geni *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, e *C-MYC* (4F). In un secondo *round*, invece è stato utilizzato un vettore lentivirale policistronico, codificante solo per i tre fattori *OCT4*, *SOX2*, e *KLF4* (3F), prodotto in collaborazione con il gruppo del Prof. Naldini dell'Istituto S. Raffaele. Come valore di *multiplicity of infection* (MOI) (numero di particelle virali/cellula) abbiamo utilizzato 1.66, un valore che rappresenta un buon compromesso tra l'espressione dei transgeni, vitalità cellulare e mantenimento dell'integrità genomica. Dopo 5 giorni dall'infezione, sono state osservate le proteine OCT4 e SOX2 nei fibroblasti, indice di una corretta espressione dei transgeni (Fig. 2.1A). L'infezione con 4F ha mostrato un'efficienza di riprogrammazione pari allo 0.011% (ottenute 17 colonie da 15×10^4 fibroblasti infettati). Dopo circa 35 giorni dall'infezione, sono state selezionate colonie con una morfologia simile a quella delle cellule hES, che sono state amplificate e propagate sia su *feeder layer* di fibroblasti umani neonatali (*foreskin*) che su MEFs (Fig. 2.1B, sono mostrati tre cloni rappresentativi di tutti quelli generati). L'efficienza di riprogrammazione utilizzando 3F, in mancanza di *C-MYC*, è stata molto più bassa; si sono generate solo poche colonie (3-5) con un tempo di comparsa molto più lungo (circa tre settimane in più). Alla luce dei due diversi esperimenti è comunque possibile concludere che la mancanza di HTT nelle cellule portatrici della mutazione in omozigosi, non inficia il processo di riprogrammazione. Sono stati espansi e portati avanti indipendentemente 3 cloni per ogni linea di fibroblasti riprogrammati.

Per ulteriori esperimenti, sono stati selezionati in modo casuale tre cloni riprogrammati con 4F dalla linea HD509 (HD-iPS^{hom} 4F-1, HD-iPS^{hom} 4F-2 e HD-iPS^{hom} 4F-3), e due cloni riprogrammati con 3F dai HD509 (HD-iPS^{hom} 3F-1 e HD-iPS^{hom} 3F-2; Tabella 2.1). Sono stati inclusi nell'analisi anche un clone derivante dalla linea portatrice della mutazione in eterozigosi HD1657 (HD-iPS^{het} 3F-1), e due derivanti da linee di fibroblasti WT (WT-iPS 4F-1 e WT-iPS 3F-1). Tutti i cloni sono risultati positivi per i marcatori di pluripotenza, Nanog e TRA1-81 (Fig. 2.1B sono mostrati tre cloni rappresentativi di tutti quelli generati). OCT4 non è stato valutato, in quanto è uno tra i geni utilizzati per la riprogrammazione.

Analisi di PCR quantitativa hanno evidenziato come il vettore di riprogrammazione si sia efficacemente silenziato dopo la selezione dei cloni iPS. Le analisi sono state effettuate su due cloni rappresentativi (HD-iPS^{hom} 3F-1 e HD-iPS^{hom} 3F-2). Queste hanno mostrato come l'espressione dei

trascritti dei transgeni del vettore (OKS) si sia ridotta fino ai livelli non rilevabili, se comparata con i livelli presenti nei fibroblasti 10 giorni dopo l'infezione, in cui il promotore lentivirale è ancora molto attivo (Fig. 2.1C). In particolare, mentre i geni esogeni della riprogrammazione sono quasi completamente silenziati (fino a 250 volte di riduzione dell'espressione), OCT4 endogeno è fortemente espresso; ciò conferma una forte riattivazione della *machinery* trascrizionale endogena del programma di pluripotenza.

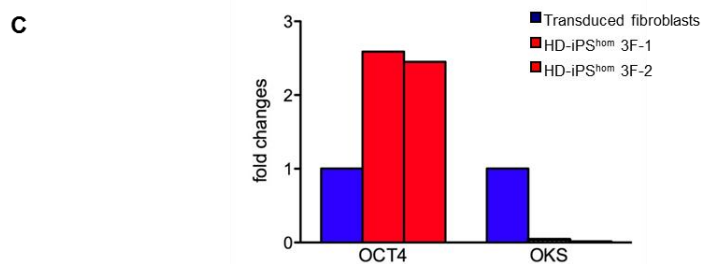
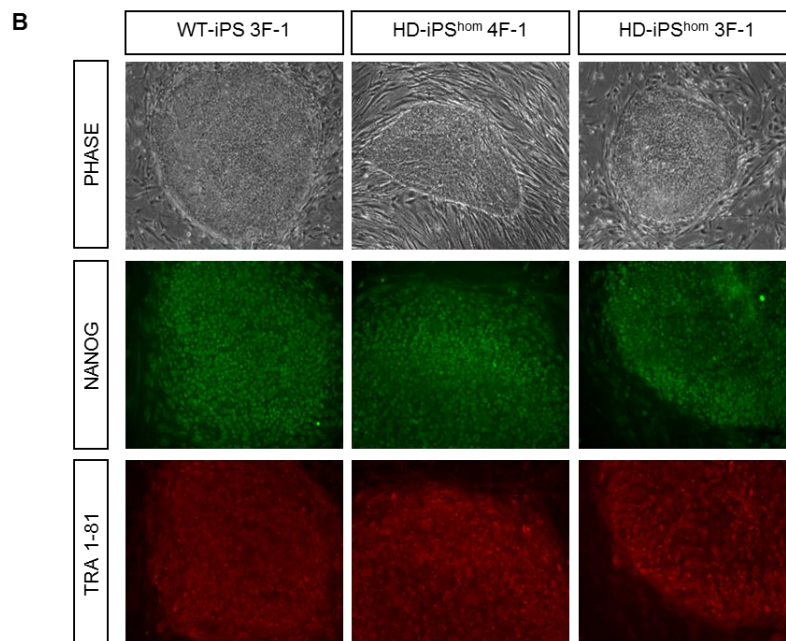
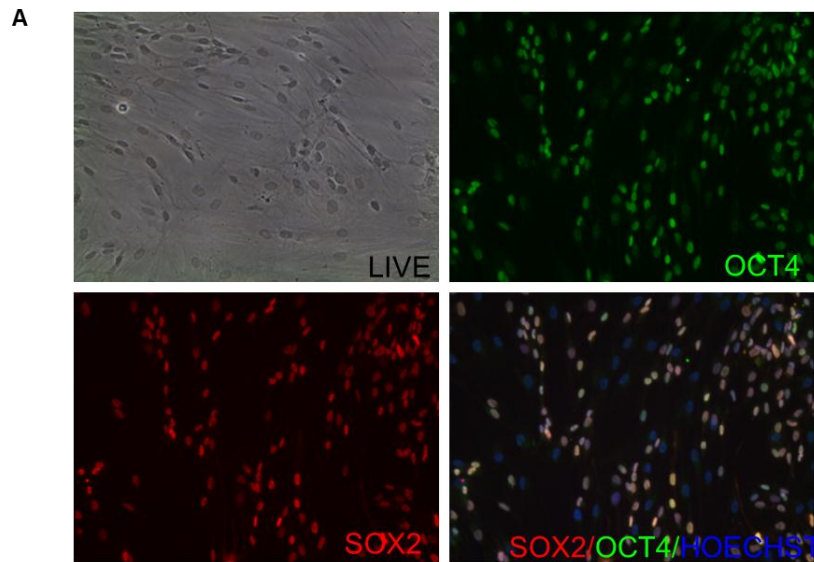


Fig. 2.1. Caratterizzazione delle linee iPS generate in *self-renewal*.

(A) Immagine in contrasto di fase della morfologia dei fibroblasti HD509 infettati. L'analisi di immunofluorescenza mostra l'espressione dei fattori di riprogrammazione OCT4 e SOX2. (B) L'immagine in contrasto di fase mostra una morfologia simile a quelle delle cellule hES; immunofluorescenza per i marcatori di pluripotenza Nanog e TRA1-81. (C) L'istogramma mostra il *fold change* dei livelli di espressione del trascritto di *OCT4* derivato dal vettore OKS, in due cloni rappresentativi di iPS (colonne rosse), relativo ai fibroblasti trasdotti (colonne blu). Per la normalizzazione è stato usato il gene *HPRT*.

Per verificare la pluripotenza dei cloni di iPS generati è stato effettuato il saggio degli EBs sulle cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS^{het} 3F-1 e HD-iPS^{hom}. Dopo 15 giorni *in vitro*, gli EBs hanno generato cellule positive per i marcatori dei tre foglietti germinativi β III-Tubulina, α -SMA, e GATA 4 (rispettivamente ectoderma, mesoderma ed endoderma) (Fig. 2.2A). Un criterio operativo ancora più definitivo per valutare la pluripotenza è il saggio di formazione del teratoma, a questo scopo, in collaborazione con il gruppo della Prof. Ssa Hovatta del Karolinska Institute, cloni di cellule iPS sono stati iniettati in topi immunodepressi. In ogni animale sono stati riscontrati segni di teratoma, contenenti componenti di ectoderma, mesoderma, e endoderma (Fig. 2.2B). Inoltre, sono state osservate tracce di tessuto del sacco vitellino, simili a quelle normalmente trovate *in vivo* nei tumori derivati da cellule germinali e nei teratomi. La natura di questo tessuto è stata evidenziata tramite analisi istochimica per i marcatori AFP e GPC3 (Zynger et al., 2010) (Fig. 2.2C). Sono state anche osservati aggregati cellulari, che ricordano nella struttura EBs, esprimenti OCT 3/4. Ciò indica un mantenimento del compartimento di cellule pluripotenti. La capacità osservata nei cloni di cellule iPS di generare tessuti del sacco vitellino non è stata osservata ad oggi in nessuna linea di ES trapiantata in animali SCID.

Successivamente, abbiamo verificato che l'infezione con lentivirus avesse comportato solo una o poche integrazioni nel genoma della cellula ospite, come atteso in base all'MOI usata. Come indice di analisi è stato utilizzato il *vector copy number per cell* (VCN), analizzato in due cloni rappresentativi generati utilizzando 3F. Come evidente dal grafico riportato in Fig. 2.2D, i cloni mostrano, come atteso, una o due copie di virus per cellula.

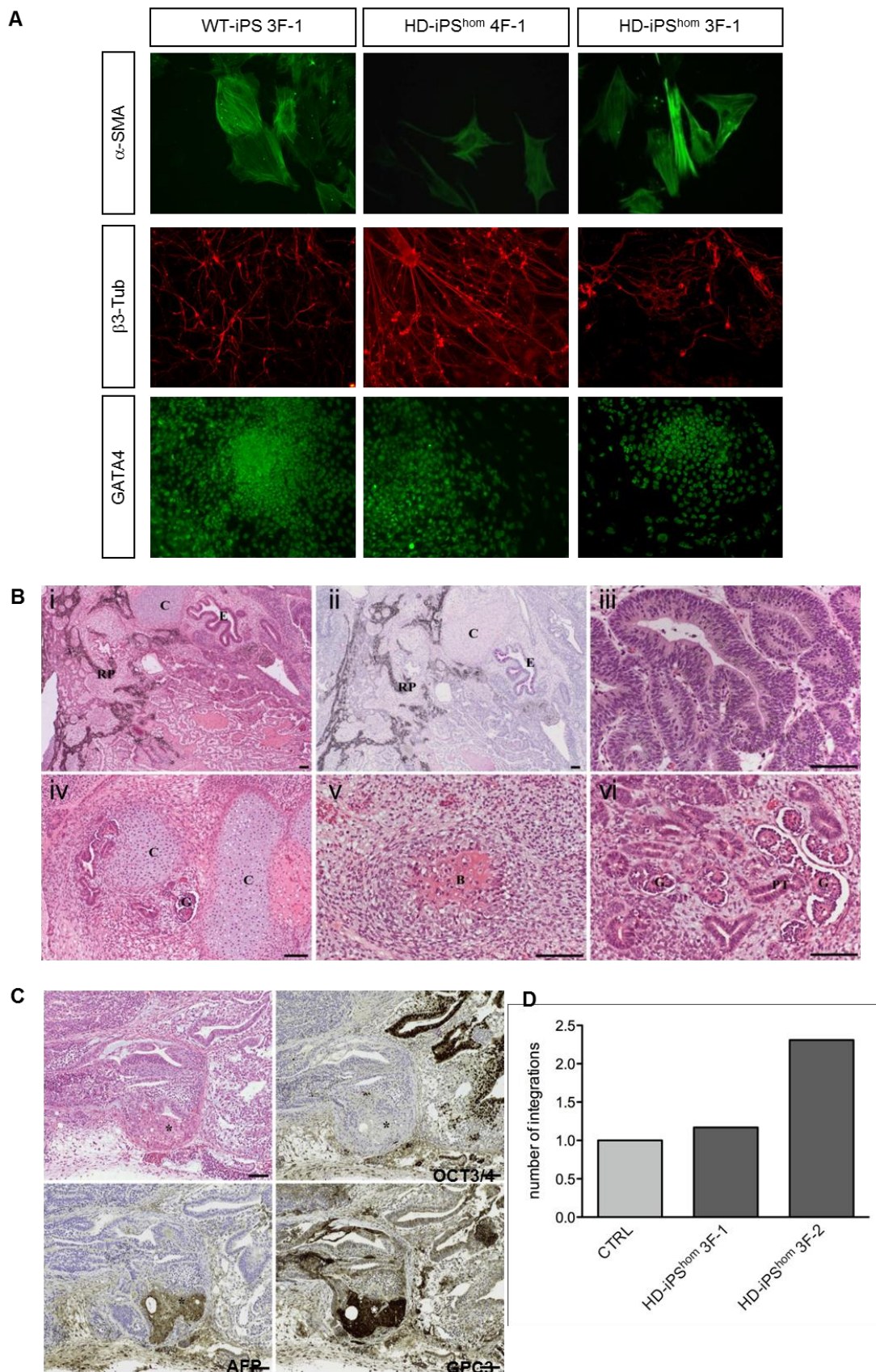


Fig. 2.2. Valutazione dei criteri di pluripotenza *in vitro* ed *in vivo*.

(A) Le linee di cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS^{hom} 4F- e HD-iPS^{hom} 3F-1 sono state differenziate ad EBs. Dopo 15 giorni di differenziamento le cellule sono risultate positive per i marcatori del mesoderma (α -SMA),

ectoderma (β III-Tubulina), e endoderma (GATA4). (B) Le cellule sono state iniettate sottopelle in topi SCID all'età di 7 settimane. Le strutture tumorali sono state osservate in ogni topo iniettato con le linee HD-iPS^{hom} 3F-1 e HD-iPS^{hom} 3F-2. Tutti i campioni sono stati marcati con ematossilina e eosina, ad eccezione della ii, la quale è marcata con PAS-Diastase. i e ii mostrano una panoramica di un'area con una presenza prominente di strutture epiteliali pigmentate che ricordano l'epitelio pigmentato della retina (RP). Nell'immagine ii, la marcatura per PASD risalta un tubulo dell'endoderma (E) con una prevalenza di cellule di Golet. L'immagine iii mostra un maggiore ingrandimento dell'epitelio pigmentato della retina, con presenza di melanina citoplasmatica. (C) Nell'immagine iv si osserva la formazione di tessuto renale, indicato dalla presenza di glomeruli primitivi (G) circondati da cartilagine (C). Nell'immagine vi è rappresentato un ingrandimento maggiore della formazione del rene primitivo con i glomeruli circondati dalla capsula di Bowman parietale e viscerale. I tubuli prossimali (PT) si estendono dai glomeruli. Nell'immagine v si osserva una formazione primitiva di osso (B), apparentemente circondata da cellule mesenchimali. Barra = 100 micrometri. (C) I teratomi contengono strutture di sacco vitellino. Nell'immagine in alto a sinistra è presente differenziamento epatico (*). Nell'angolo in alto a destra si osservano tubuli circondati da epitelio cilindrico (*). Questa struttura rivela una forte reattività nucleare con anticorpi diretti contro OCT3/4. Cellule appartenenti al tessuto epatico sono positive per AFP e GPC3. Aree positive per OCT3/4 sono negative per GPC3 e *vice versa*. Barra = 100 micrometri. (D) L'analisi del *vector copy number* su due cloni rappresentativi rivela una o due integrazioni virali per cellula. L'analisi è stata effettuata tramite RT-qPCR su DNA genomico (vedi Materiali e Metodi).

2.2 La lunghezza della ripetizione del tratto CAG non interferisce con il processo di riprogrammazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule iPS

In letteratura è riportato che il tratto CAG ripetuto nell'HTT, potrebbe andare incontro ad instabilità somatica in modelli malattia murini transgenici e in cervello di pazienti HD, soprattutto nello striato (Kennedy et al., 2003) (Gonitel et al., 2008) (Dragileva et al., 2009). È stato ipotizzato che la variazione cervello-specifica della lunghezza del tratto CAG, potrebbe modificare il processo patogenetico (Kennedy et al., 2003). Inoltre, è stato riportato in una linea di cellule hES portatrice del gene mutato HD, un'espansione (limitata) di 5 ripetizioni del tratto CAG dopo il differenziamento neuronale (Niclis et al., 2009), sebbene questo comportamento non sia stato poi osservato in altre linee (Seriola et al., 2011). Alla luce di queste evidenze, abbiamo verificato il comportamento del tratto CAG in fase di proliferazione (dopo la riprogrammazione) e dopo il differenziamento neuronale, in collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Gellera dell'Istituto Neurologico "C. Besta" di Milano. Per questo tipo di analisi abbiamo effettuato un'elettroforesi capillare con *ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer*. In Tabella 2.2 è riportato che tutte le linee di cellule HD-iPS hanno mantenuto la stessa lunghezza del tratto CAG riscontrato nei fibroblasti di

origine.

Fibroblast lines	iPS lines	Cell passage	Haplotype
HD509	HD-iPS ^{hom} 4F-1	20	42/44
	HD-iPS ^{hom} 4F-1	40	42/44
	HD-iPS ^{hom} 4F-2	12	42/44
	HD-iPS ^{hom} 3F-1	13	42/44
	HD-iPS ^{hom} 3F-2	13	42/44
HD832	HD-iPS ^{hom} 4F-3	46	39/43

Tabella 2.2. Analisi della lunghezza del CAG dopo il processo di riprogrammazione e durante i passaggi *in vitro*.

Inoltre, l'analisi del DNA del clone HD-iPS^{hom} 4F-1 ha mostrato che il tratto CAG rimane stabile fino a 40 passaggi *in vitro*. (Fig. 2.3A e Tabella 2.2). Dopo 30 giorni dall'induzione del differenziamento neurale, le linee di cellule HD-iPS non hanno mostrato espansione del tratto CAG. Al contrario, è stata occasionalmente misurata una contrazione delle ripetizioni della tripletta; ad esempio un aplotipo di 42/44 CAG ha perso due triplette CAG (Fig. 2.3B). Questi dati indicano come il tratto CAG nel gene umano rimane stabile durante i passaggi e dopo differenziamento neuronale.

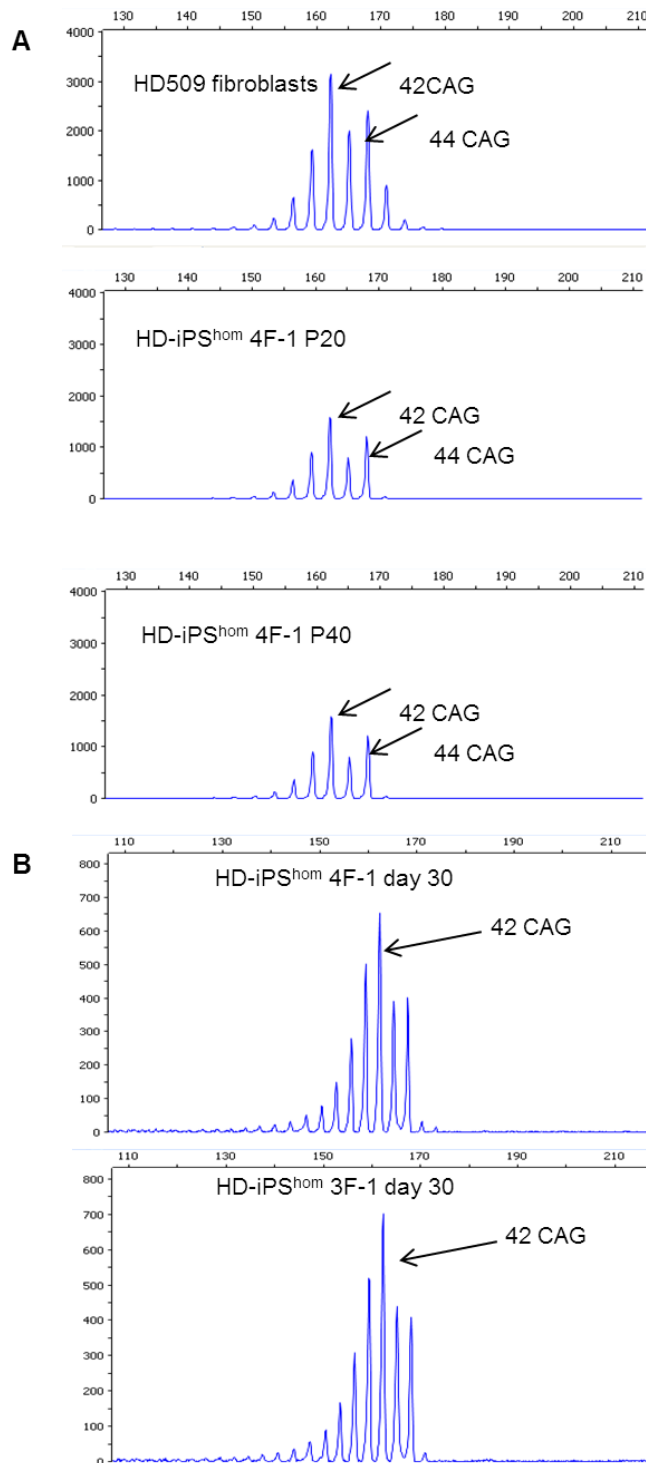


Fig. 2.3. Stabilità del tratto CAG in proliferazione ed in differenziamento in cellule iPS riprogrammate.

(A) La stabilità del tratto CAG è stata analizzata in *self-renewal* nei fibroblasti d'origine (in alto), e dopo la riprogrammazione al passaggio 20 (P20) e al 40 (P40). Lo spettro capillare della lunghezza dei frammenti indica picchi prevalenti a 162 e 168 paia di basi, le quali corrispondono, rispettivamente, a 42 e 44 ripetizioni del CAG. (B) Al giorno 30 del differenziamento lo spettro capillare della lunghezza dei frammenti indica un picco prevalente a 162 paia di basi, che corrispondono 42 ripetizioni del tratto CAG.

2.3 Il differenziamento neurale di cellule HD-iPS è variabile, ma non influenzato dalla lunghezza del tratto CAG

Per verificare la capacità delle linee di cellule HD-iPS generate di differenziare verso il destino neuronale, è stato applicato il protocollo di differenziamento in monostrato descritto da Chambers e colleghi nel 2009 (vedi introduzione). In questo caso non sono stati aggiunti morfogeni per indirizzare le cellule verso un destino striatale, in quanto l'intento era saggiare una capacità differenziativa pan-neuronale. Al giorno 15 del differenziamento è stata monitorata l'espressione di marcatori del neuroectoderma. Come mostrato in figura 2.4 sia i cloni di cellule WT che le linee di cellule HD-iPS sono positivi per nestin e PAX6, con una tempistica simile a quella della linea di cellule hES H9 usata come controllo interno. Le diverse linee di cellule iPS hanno risposto in maniera comparabile al protocollo di differenziamento, in quanto circa il 20% delle cellule in tutte le linee ha mostrato espressione di PAX6 (Fig. 2.4A,B). Successivamente, abbiamo verificato la capacità di diventare neuroni maturi. I progenitori neurali generati sono stati ripiastrati e mantenuti in un *medium* contenente N2, B27 e BDNF. Al giorno 30 del differenziamento sono diventati visibili neuriti provenienti da *clusters* cellulari. Anche in questo stadio non sono risultate evidenti differenze nel tempo di comparsa dell'espressione di β III-Tubulina e MAP2 (Fig. 2.4A); la percentuale di cellule β III-Tubulina⁺ è risultata intrinsecamente variabile tra le linee di cellule HD-iPS, variando dal 12% \pm 1.20 al 34% \pm 2.40 (Fig. 2.4A,C). Ciò non ci è risultato inaspettato, in quanto è stato già riportato come la capacità differenziativa sia intrinsecamente differente tra diverse linee di cellule ES e di iPS (Osafune et al., 2008; Kim et al., 2010; Hu et al., 2010; Kim et al., 2011). Prolungando il differenziamento fino a 50 giorni, sia le cellule HD-iPS che le cellule WT-iPS hanno mostrato una quantità equivalente di cellule immunopositive per GABA (Fig. 2.4D).

I sottotipi neuronali maggiormente affetti nell'HD sono i neuroni striatali e corticali (Reiner et al., 1988). Tuttavia, le alterazioni dello sviluppo di questi tipi neuronali avvengono soprattutto durante la specificazione neuronale. Ad esempio, è stato descritto come neuroni striatali derivati dal modello murino di HD portatore di 111 ripetizioni del tratto CAG (HdhQ111 *mice*), esprimessero Nanog, SOX2 e Stat3. Questa espressione genica aberrante sembra rendere i neuroni più suscettibili alla patologia (Molero et al., 2009). Allo scopo di verificare se esistesse una grossolana alterazione dei programmi di sviluppo, le linee cellulari WT-iPS 3F-1 e HD-iPS^{hom} 4F-1 sono state esposte ad un protocollo di differenziamento cellulare per oltre 50 giorni. Ai giorni 0, 10 e 20 è stata analizzata l'espressione dell'mRNA di Nanog e di geni coinvolti nella specificazione anteriore, come SIX3 e FOXG1. L'analisi tramite RT-PCR (Fig. 2.4E) ha mostrato, come atteso, che l'mRNA di Nanog non viene osservato durante il differenziamento neuronale sia nelle linee di cellule WT che in quelle

HD. D'altra parte, entrambe le linee cellulari esprimono SIX3 e FOXP1 dopo 20 giorni di differenziamento. Inoltre, al giorno 50 del differenziamento è stata verificata, tramite RT-PCR, la presenza di specifici marcatori GABAergici, come *GAD65/67*, e striatali come *ARPP-21* e *DARPP-32* (Fig. 2.4E). Non sono state riscontrate differenze significative tra le due linee, attribuibili alla diversa lunghezza del tratto CAG. Questo ci permette di concludere che la mutazione dell'HD in questo modello *in vitro* probabilmente non inficia il differenziamento e la specificazione del destino neuronale anteriore.

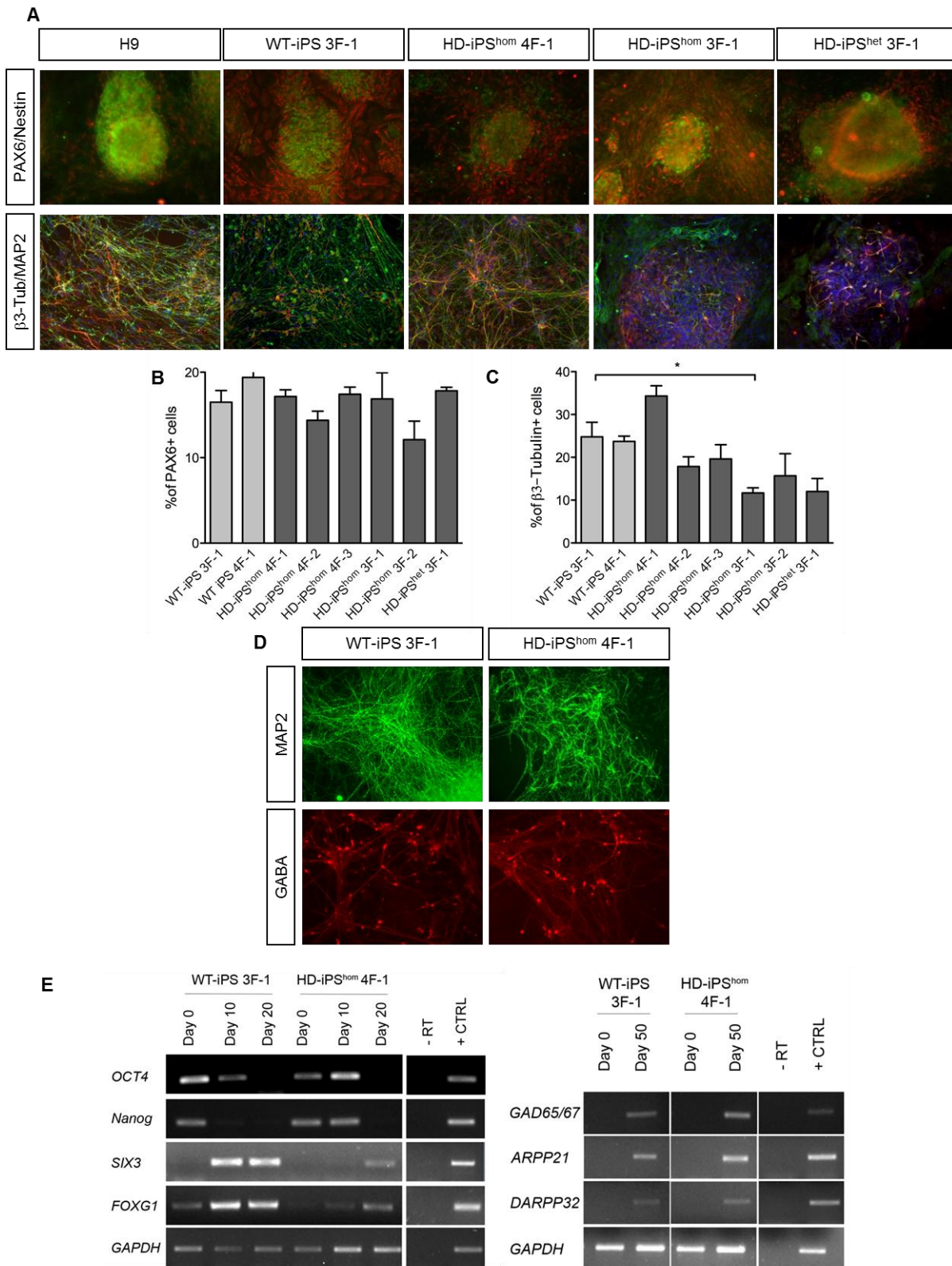


Fig. 2.4. Linee di cellule iPS HD e WT differenziano verso neuroni maturi con identità anteriore.

(A) Al giorno 15 del differenziamento si formano rosette neurali positive per PAX6 (verde) e nestin (rosso). Sono state testate tutte le linee di cellule iPS generate (sia WT che HD) e comparate con la linea di cellule hES H9, usata come controllo interno. E' mostrato un clone per ogni linea di cellule iPS derivata. Dopo 30 giorni di differenziamento, i neuroni generati esprimono β III-Tubulina (verde) e MAP2 (rosso). (B) La

percentuale delle cellule PAX6⁺ è stata calcolata contando tre campi di cellule/clone. Test statistici usati: *one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test*. (C) La percentuale delle cellule β III-Tubulina⁺ è stata calcolata contando tre campi di cellule/clone. Test statistici usati: *one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test*. *p<0.05. (D) Prolungando il differenziamento fino al giorno 50 in un *medium* addizionato con supplementi e neurotrofine, sia le cellule WT-iPS che le cellule HD-iPS^{hom} 4F-1 sono risultate positive per GABA. (E) Analisi di RT-PCR eseguite durante la fase di induzione neurale mostrano cambiamenti, dopo 0, 10 e 20 giorni, nell'espressione dell'mRNA dei geni *Nanog*, *SIX3* e *FOXG1*. E' stato usato il gene *GAPDH* per normalizzare i livelli di espressione. Dopo 55 giorni di differenziamento, i neuroni terminalmente differenziati esprimono marcatori GABAergici e striatali.

2.4 Validazione di fenotipi associati alla malattia, in cellule HD-iPS

Allo scopo di validare il possibile uso di cellule iPS come modello malattia, sono stati analizzati specifici *readouts* molecolari implicati nella patogenesi della malattia, descritti in modelli animali e cellulari.

Come prima analisi, sono stati considerati i processi cellulari di proliferazione, morte ed espansione lisosomiale. L'attività di proliferazione e di apoptosi è stata analizzata in condizione di *self-renewal* tramite immunofluorescenza. In particolare, è stato utilizzato il fosfo-istone H3 (PH3) che identifica cellule nella fase di mitosi, e la caspasi 3 attivata, che invece marca le cellule in apoptosi. La figura 2.5A mostra l'assenza di differenze significative nel *rate* di proliferazione, come indicato dalla percentuale di cellule positive per PH3, tra le linee di cellule WT e HD-iPS. In particolare, il numero di cellule positive per PH3 ha mostrato che circa il 5% della popolazione controllo è in fase M del ciclo cellulare, e ciò non è stato alterato dalla mutazione HD, in quanto la linea di cellule HD-iPS si comporta in modo analogo (Fig. 2.5A,B). Lo stesso comportamento è stato osservato in tutte le linee di cellule HD-iPS (dato non mostrato). Successivamente è stata valutata l'apoptosi tramite la conta di cellule immunoreattive per la caspasi 3 attivata; non sono state riscontrate differenze nel comportamento tra linee con diversi genotipi, suggerendo che la presenza della mutazione non è sufficiente ad attivare il programma di morte cellulare (Fig. 2.5A).

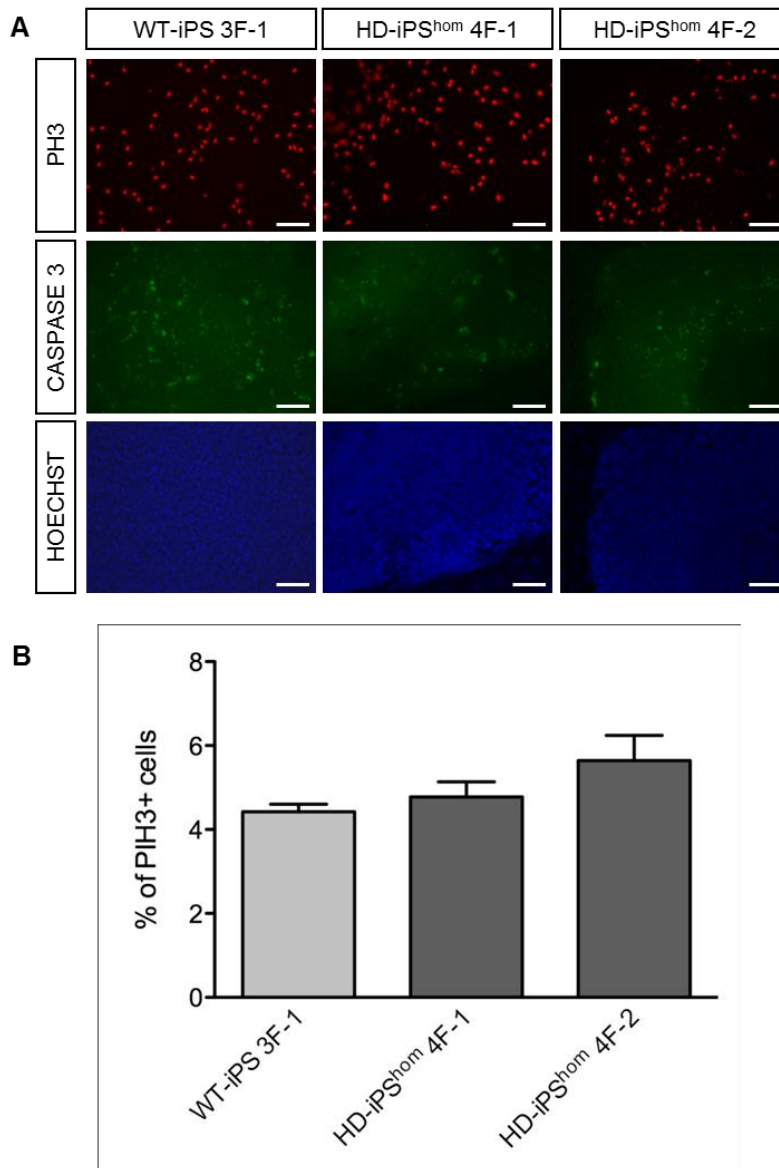


Fig. 2.5 Le linee di cellule HD-iPS non mostrano differenze nella proliferazione e nell'apoptosi rispetto ai controlli.

(A) Le linee di cellule iPS analizzate in *self-renewal* sono: WT-iPS 3F-1, HD-iPS^{hom} 4F-1, e HD-iPS^{hom} 4F-2. Non sono risultate evidenti differenze tra le diverse linee sia nel *rate* di proliferazione, che nell'attività della caspasi 3 attivata (intensità del segnale: WT-iPS 3F-1: 30.4 ± 4.1 ; HD-iPS^{hom} 4F-1: 21 ± 4.1 ; e HD-iPS^{hom} 4F-2: 20.7 ± 1.8). (B) Per la quantificazione sono stati analizzati quattro campi di cellule/clone. Le barre di errore mostrano l'errore standard della media (SEM) valutato tramite i test statistici dell'*one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test*.

In letteratura è stata descritta la presenza di aggregati di HTT mutata nei neuroni cerebrali *post-mortem* e in diversi modelli animale (Zuccato et al., 2010). Inoltre, è stata evidenziata, in colture di cellule di mammifero, una forte correlazione tra gli aggregati di HTT e la suscettibilità alla morte cellulare (Zuccato et al., 2010). D'altra parte, un set indipendente di dati dimostra come gli

aggregati di HTT abbiano una funzione neuroprotettiva, in quanto agiscono stimolando il processo autofagico e aumentando la *clearance* dell'HTT mutata (Ravikumar and Rubinsztein, 2006). Nelle cellule di mammifero sono attivi due *pathways* principali deputati alla *clearance* proteica: il *pathway* del proteasoma e dell'ubiquitina e quello dell'autofagia e dei lisosomi. In neuroni derivati da tessuto cerebrale *post-mortem* di pazienti HD e in modelli cellulari della patologia, è stato descritto un aumento delle strutture autofagosoma-simili (Davies et al., 1997; Ravikumar et al., 2004; Sapp et al., 1997).

Partendo da queste osservazioni, è stata analizzata la quantità di lisosomi presenti durante la fase di *self-renewal*. Per i diversi saggi è stato usato il LysoTracker® Red DND-99, un marcatore fluorescente che emette nel rosso, in grado di marcare, in cellule vive, i compartimenti acidi come i lisosomi. Le cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS^{hom} 4F-1, e HD-iPS^{hom} 4F-2 sono state esposte al LysoTracker per 30 minuti, successivamente sono state fissate, e le immagini acquisite sono state analizzate con il *software* ImageJ, per misurare l'intensità del segnale fluorescente nelle cellule positive. Come mostrato in figura 2.6A, il segnale fluorescente è molto brillante nelle cellule HD-iPS. In particolare, si è riscontrato che linee di cellule HD-iPS mostrano un accumulo di segnale fino a 4 volte maggiore di quello osservato nelle cellule WT-iPS (Fig. 2.6A,B). Questi risultati suggeriscono che le linee di cellule HD-iPS presentano un numero di lisosomi maggiore rispetto alle linee controllo.

Per confermare questa osservazione, e per quantificare la differenza osservata, si è utilizzata la tecnica della citofluorimetria a flusso su cellule vive dopo marcatura con il LysoTracker. Per evidenziare maggiormente la risposta delle diverse linee di cellule iPS in termini di numero di lisosomi attivati, i cloni di cellule iPS omozigoti per la mutazione sono stati esposti al saccarosio per 48 ore, in grado di ingolfare il sistema dei lisosomi (Sardiello et al., 2009). L'analisi è stata eseguita ponendo la soglia del segnale sul controllo isotipico. Ciò ha mostrato che la proporzione di cellule HD-iPS marcate supera di due volte quelle delle WT-iPS (Fig. 2.6C). Questa analisi suggerisce che le cellule HD-iPS sono molto suscettibili agli agenti stressanti.

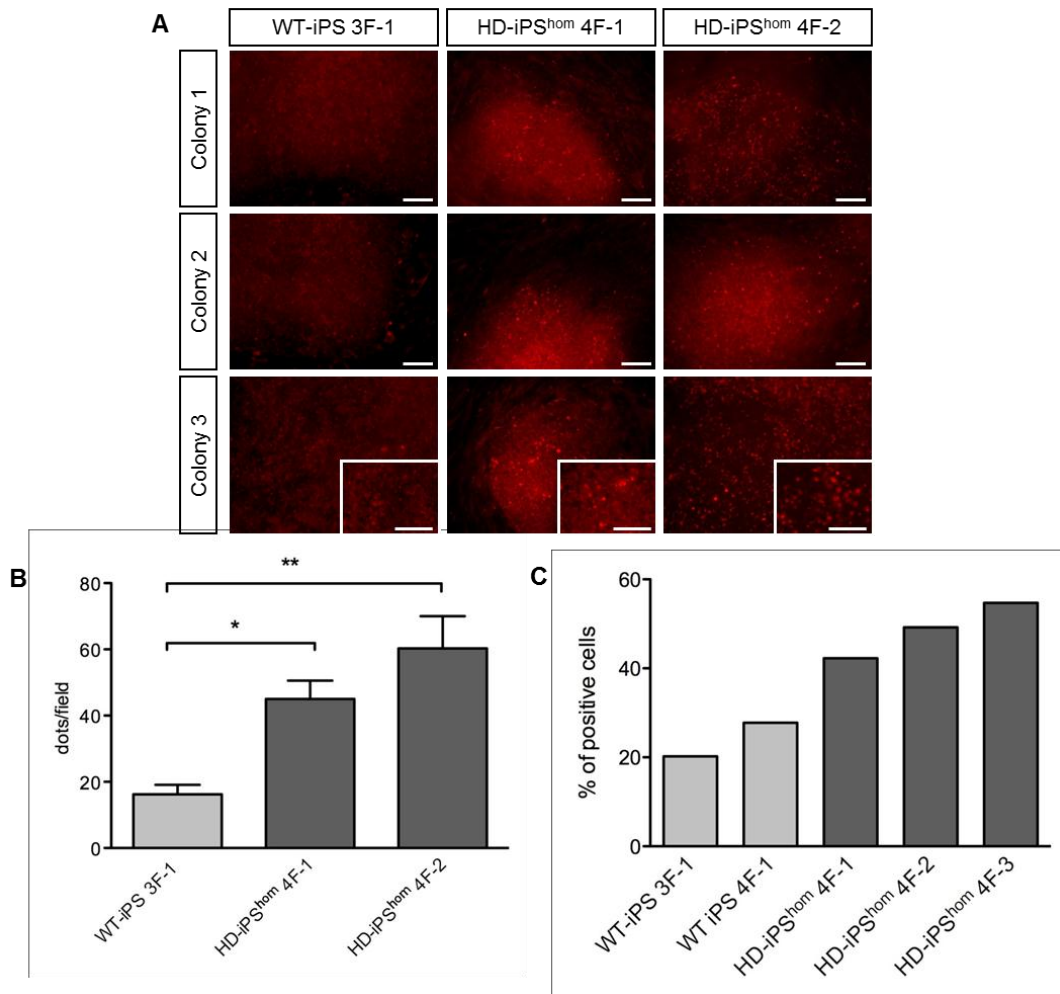


Fig. 2.6. Le linee di cellule HD-iPS in condizione di *self-renewal* mostrano un aumento del numero di lisosomi.

(A) Sono mostrate tre colonie rappresentative per ogni clone di cellule iPS analizzato con LysoTracker. I riquadri mostrano un maggiore ingrandimento della parte centrale delle colonie. Barra = 100 micrometri. (B) Le immagini acquisite sono state analizzate con il *software* ImageJ per quantificare il numero di cellule positive per campo. Sono stati analizzati tre campi/clone, di due esperimenti indipendenti. Il numero di punti positivi/campo è 16.25 ± 2.83 nelle cellule WT-iPS; 45.01 ± 5.56 nelle cellule HD-iPS^{hom} 4F-1; e 60.33 ± 9.68 nelle cellule HD-iPS^{hom} 4F-2. Le barre di errore mostrano la SEM valutata tramite *one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test* * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (C) Il grafico rappresenta l'analisi di citofluorimetria effettuata su cellule vive dopo lo *staining* con LysoTracker e l'esposizione al saccarosio per 48 ore. Sono state analizzate 2×10^4 cellule/linea; la soglia è stata regolata sul segnale del controllo isotipico.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto sulle cellule WT-iPS e HD-iPS^{hom} 4F-1 sottoposte al protocollo di differenziamento neurale. Dopo 5 giorni di differenziamento, la quantità di cellule HD-iPS marcate dal LysoTracker è risultata di due volte maggiore (46.79 ± 4.09) rispetto alle cellule controllo (22.62 ± 3.21) (Fig. 2.7A,B). L'analisi è stata poi estesa a cellule differenziate per 25 giorni, in modo da valutare l'attività lisosomiale anche in neuroni maturi. E' risultato evidente

che, dopo il trattamento con saccarosio, il valore assoluto dell'intensità di fluorescenza del segnale era più alto in tutte le linee di cellule differenziate, rispetto alle linee controllo (Fig. 2.7C). In questa analisi è stato fissato un secondo valore soglia sull'intensità di fluorescenza di 10^4 . Anche in questo caso, le cellule HD-iPS hanno mostrato una percentuale di cellule positive al LysoTracker maggiore rispetto alle linee controllo (Fig. 2.7C,D).

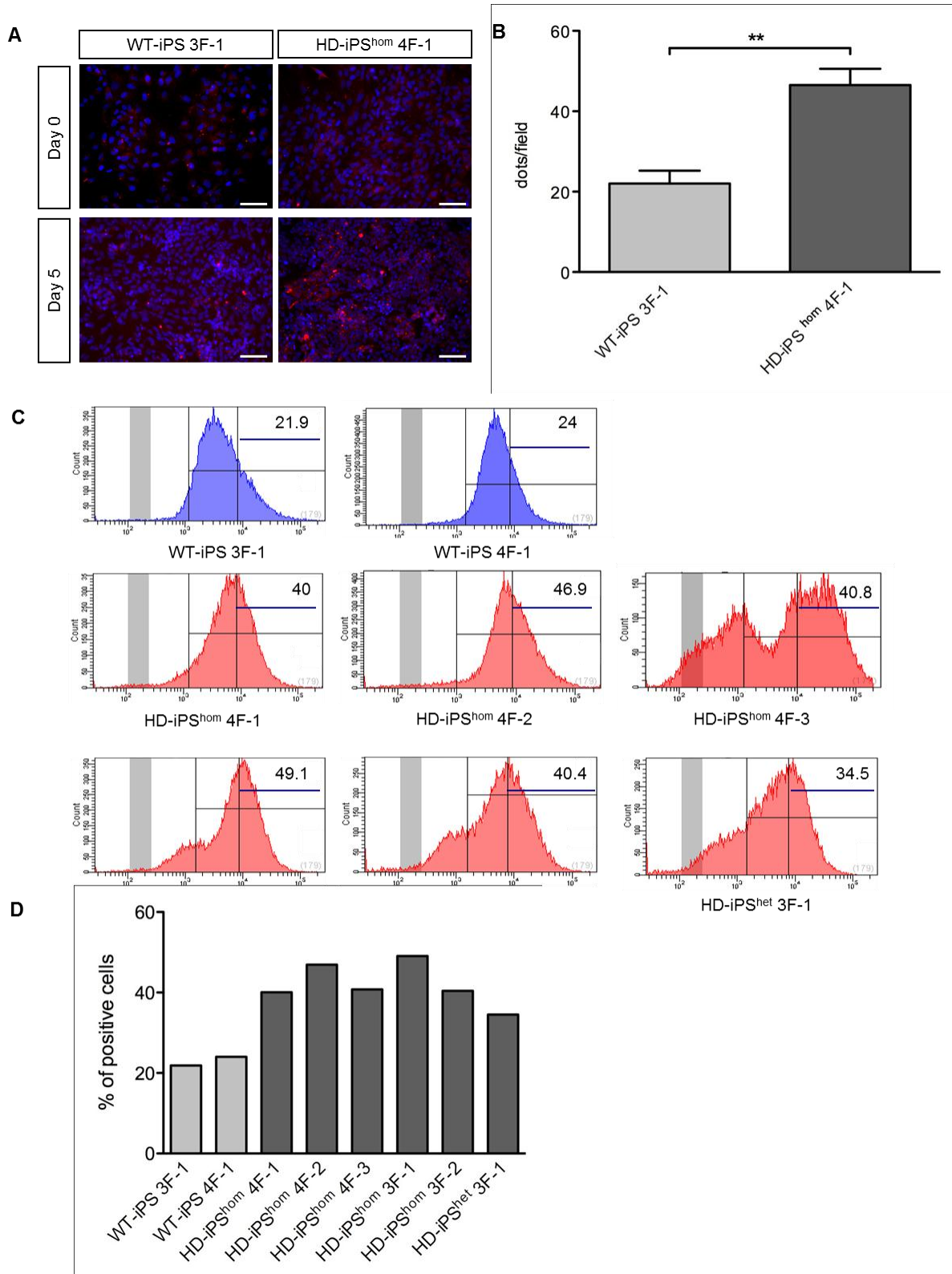


Fig. 2.7. Linee di cellule HD-iPS mostrano un aumento del numero di lisosomi durante il differenziamento neurale.

(A) L'analisi del LysoTracker è stata effettuata al giorno 5 del differenziamento neurale sulle linee di cellule WT-iPS 3F-1 e HD-iPS^{hom} 4F-1. La linea di cellule HD-iPS mostra un segnale maggiore rispetto alla linea controllo. Barra = 100 micrometri. (B) Quantificazione dei punti positivi al LysoTracker tramite il *software* ImageJ. L'intensità del segnale è stata normalizzata sul numero totale di cellule. Sono stati analizzati cinque campi di cellule/cloni da due esperimenti indipendenti. Le barre di errore mostrano la SEM valutata tramite *one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test* ** $p < 0.01$. (C-D) Analisi di citofluorimetria sui cloni di cellule iPS al giorno 25 del differenziamento, dopo esposizione al saccarosio per 48 ore. Le barre blu indicano la proporzione di cellule con valore di intensità del segnale maggiore della soglia posta a 104. Sono state analizzate 2×10^4 cellule/linea.

Inoltre, i neuroni derivati dalla linea di cellule iPS HD-iPS^{het} 3F-1 hanno mostrato risultati simili a quelli esibiti dalle linee di cellule omozigoti (Fig. 2.7C,D). Questi dati suggeriscono che l'attivazione lisosomiale è simile tra i neuroni derivati sia dalle linee di cellule iPS omozigoti che eterozigoti.

Lo stesso fenotipo è stato osservato anche nel modello cellulare di HD-iPS murine (Castiglioni et al., 2011). Per verificare ulteriormente questo dato è stata utilizzata la tecnica del Western Blot per valutare la presenza del marcatore di autofagia LC3 in cellule al giorno 30 del differenziamento. Sono state analizzate le linee di cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS^{hom} 4F-1 e HD-iPS^{het} 3F-1 (Fig. 2.8A).

La macroautofagia è un processo lisosoma-dipendente che media il *turnover* degli organuli cellulari e delle proteine danneggiate, che non riescono ad essere degradate dal sistema proteasomale, come ad esempio gli aggregati di HTT (Kegel et al., 2000). Dopo la sintesi, LC3 è processato nella proteina citosolica LC3 BI. L'attivazione del processo di macroautofagia porta alla conversione dell'LC3 BI nell' LC3 BII, una forma associata all'autofagosoma. Come conseguenza di questo processo, la quantità di LC3 BII presente è correlata con il numero di autofagosomi. Il rapporto tra LC3 BII/LC3 BI è stato usato come misura della formazione di autofagosomi (Fox et al., 2010; Kabeya et al., 2000) (Fig. 2.8). In accordo con i dati della marcatura con LysoTracker, la forma LC3 BII è più abbondante nelle linee di cellule HD-iPS rispetto alla linea controllo. Questo dato rinforza l'evidenza di un aumento del numero di lisosomi e specificamente di autofagosomi, nelle linee di cellule HD-iPS. Ciò è in accordo con i dati descritti in un modello di HD di neuroni primari di ratto, trasfettati con HTT mutata (Liang et al., 2011).

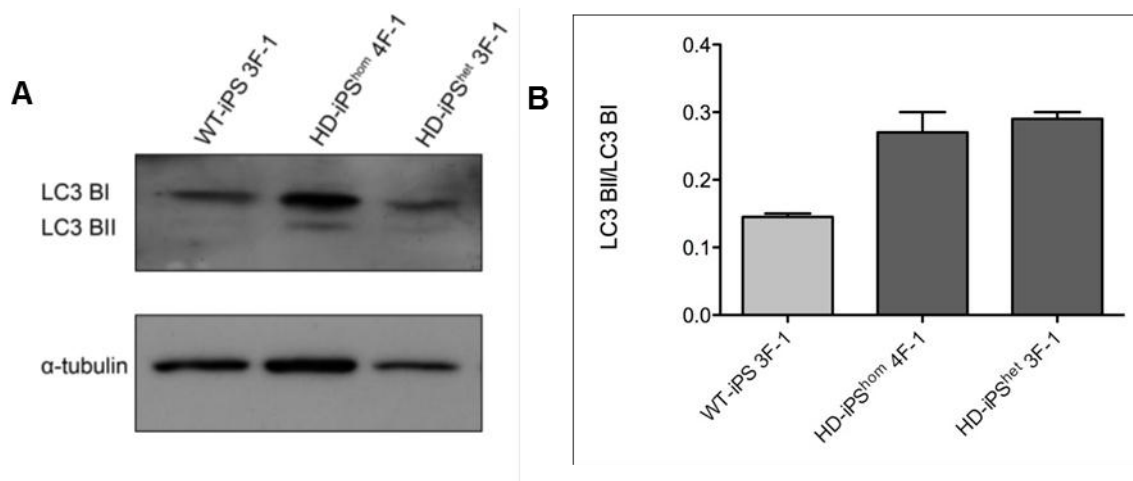


Fig. 2.8. L'analisi del marcatore di autofagosoma LC3 conferma una maggiore attivazione del sistema lisosomiale nelle cellule HD-iPS rispetto ai controlli.

(A) Analisi di Western Blot per il marcatore LC3 sulle linee di cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS^{hom} 4F-1 and HD-iPS^{het} 3F-1, dopo 30 giorni di differenziamento neurale. (B) Analisi densitometrica dell'analisi di Western Blot del marcatore LC3, eseguita sulle cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS^{hom} 4F-1 e HD-iPS^{het} 3F-1 dopo 30 giorni di differenziamento neurale.

Questi dati ci permettono di concludere che le cellule iPS generate da pazienti HD, mostrano, *in vitro*, caratteristiche simili a quelle delle cellule hES. Inoltre, differenziano verso il fenotipo neurale e sono in grado di ricapitolare alcuni aspetti della patologia. Ciò rende questo tipo cellulare un buon candidato per la generazione di modelli malattia.

Discussione

Messa a punto di un protocollo per il differenziamento diretto, *in vitro*, di cellule staminali pluripotenti verso neuroni con caratteristiche di MSNs

Tramite l'applicazione dei principi che regolano la specificazione telencefalica ventrale, siamo stati in grado di ricapitolare *in vitro* il processo di neurogenesi striatale e di istruire cellule pluripotenti (PS) verso MSNs striatali di proiezione, specifici per identità posizionale e per caratteristiche funzionali, quali la capacità di generare potenziali d'azione e di rispondere in maniera appropriata a neurotrasmettitori. Il protocollo messo a punto si basa su un processo di differenziamento in monostrato, privo di co-coltura con cellule stromali o di altro tipo, che comincia con la specializzazione neuroectodermica indotta dall'inibizione della via del segnale di BMP/TGF- β , tramite l'utilizzo di noggin/dorsomorfinina e SB431542 (Chambers et al., 2009).

L'attività cruciale di noggin come induttore neurale è stata dimostrata da studi effettuati nello *Xenopus* (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1994; Smith and Harland, 1992) nei mammiferi (Valenzuela et al., 1995) e in cellule pluripotenti (Chambers et al., 2009; Itsykson et al., 2005; Kriks et al., 2011; Shi et al., 2012). Le cellule neuroepiteliali che si formano durante le prime fasi dello sviluppo acquisiscono un fenotipo rostrale (Stern, 2001), come descritto dal modello a due segnali proposto da Nieuwkoop e supportato da ricerche in anfibi (Nieuwkoop, 1952). Allo stesso modo, la progenie neurale differenziata da cellule ES murine ed umane mostra prima un fenotipo anteriore (Pankratz et al., 2007; Watanabe et al., 2005; Gaspard et al., 2008; Li et al., 2009b) e poi diventa caudalizzata. Attraverso i segnali anti-caudalizzanti che bloccano WNT e Nodal, i progenitori neurali derivati da cellule ES murine e umane, mantengono un'identità telencefalica (Watanabe et al., 2005; Li et al., 2009b). In questo lavoro di Tesi, è stato efficacemente confermato e riprodotto questo processo. Cellule PS durante le prime fasi del differenziamento assumono caratteristiche rostrali, come dimostrato dall'espressione di diversi fattori di trascrizione quali *SIX3*, *OTX2* e *FOXP1*, mantenute dal blocco del segnale di WNT tramite l'aggiunta di DKK-1.

Riguardo alla specificazione del *subpallium*, questa dipende soprattutto dall'azione di SHH sia *in vivo* (Chiang et al., 1996; Fuccillo et al., 2004; Kohtz et al., 1998; Shimamura and Rubenstein, 1997; Xu et al., 2010), che *in vitro*, in quanto SHH indirizza cellule ES murine verso il destino di *subpallium* (Danjo et al., 2011). La specificazione ventrale nelle cellule hES richiede l'azione coordinata dell'inibizione di WNT e l'attivazione di SHH (Li et al., 2009b), quest'ultima attuata tramite la soppressione dell'isoforma repressiva di GLI3. Durante la fase di induzione neurale, nel nostro protocollo, abbiamo combinato l'azione di SHH con quella di DKK-1, mantenuta per un

periodo sufficiente a specificare un'identità telencefalica ventrale, dimostrata dalla presenza di GSX2. La concentrazione di SHH utilizzata in questo lavoro di Tesi è la stessa descritta nel lavoro di Ma *et al.* (2012). Tuttavia, il protocollo descritto dal gruppo del Prof. Zhang è basato su fasi seguenti di aggregazione/sospensione/piastramento, dopo isolamento meccanico di rosette, per generare presunti progenitori striatali e neuroni DARPP-32⁺, le cui proprietà descritte non rivelano una reale identità di MSNs. Ad esempio, non sono state analizzate co-espressioni cruciali di marcatori striatali. Questo è un punto particolarmente importante per definire la fase di caratterizzazione di un protocollo di differenziamento *in vitro*, in quanto per determinare la precisa identità di un sottotipo neurale è necessario verificare la presenza contemporanea di molteplici marcatori *lineage*-specifici. Nel nostro caso, questo tipo di analisi è stata parallela a quella effettuata *in vivo* su tessuto fetale, e ci ha permesso di definire quali sono i marcatori stadio-specifici cruciali e diagnostici delle diverse fasi dello sviluppo del telencefalo e dello striato. Le informazioni raccolte devono essere poi traslate all'*in vitro*, per verificare il corretto susseguirsi degli eventi dello sviluppo. Ad esempio, per quanto riguarda la fase di generazione di progenitori telencefalici/striatali, è necessario accoppiare marcatori quali FOXP1 (marcatore di telencefalo) con GSX2 (marcatore di telencefalo ventrale), non analizzati nel lavoro di Ma *et al.* 2012. Questo protocollo è stato già descritto nell'introduzione di questo lavoro di Tesi, e rappresenta al momento l'unico protocollo alternativo disponibile in letteratura per la generazione di neuroni striatali da cellule staminali embrionali umane. Considerando invece la fase di differenziamento terminale è necessario accoppiare l'espressione di DARPP-32 ad altri marcatori striatali, quale CTIP2, quest'ultimo nuovamente non analizzato nel lavoro di Ma e colleghi (2012). Ciò lascia una lacuna nella caratterizzazione dei progenitori e dei neuroni generati in questo lavoro.

Nella fase di differenziamento terminale del nostro protocollo, i precursori striatali esprimono marcatori dell'LGE quali CTIP2, FOXP1, FOXP2 e *ISL1*, e altri marcatori presunti del fenotipo striatale, come *LIX1*, *CXCR7*, *SOX5*, *EBF1*, e *ZFP503* identificati tramite l'analisi di espressione genica con piattaforma Illumina. Alla fine del differenziamento il 51% delle cellule è composto da neuroni MAP2⁺, il 78% dei quali ha un fenotipo GABAergico. L'identità di MSNs è stata dimostrata tramite la verifica di espressione di un pannello di marcatori, tra cui DARPP-32, CTIP2, FOXP1, FOXP2, CALB1, GAD65/67 e *ARPP-21*. Sul totale delle cellule MAP2⁺, il 61% è composto da cellule CTIP2⁺ (l'86% delle quali co-esprime GABA, confermando un fenotipo GABAergico e non corticale) e il 20% è composto da cellule DARPP-32⁺.

Accanto alla maturazione antigenica descritta, è necessario verificare che i neuroni terminalmente differenziati generati abbiano acquisito anche l'espressione di recettori e capacità funzionali ed elettrofisiologiche tipiche di MSNs maturi. Dopo aver dimostrato la presenza di recettori per la

dopamina e per l'adenosina, il 74% dei neuroni ha manifestato proprietà funzionali tipiche di neuroni maturi come dimostrato dalla presenza di potenziali d'azione ripetitivi. Inoltre sono state registrate sPSC GABAergiche inibitorie, e soprattutto risposta alla neuromodulazione indotta dalla dopamina, caratteristica presente nel 60% dei neuroni analizzati. Un'ulteriore conferma è stata fornita dalla capacità dei neuroni striatali generati di maturare in senso funzionale dopo trapianto in cervello di ratto e di integrarsi sinapticamente con i neuroni dell'ospite. D'altra parte, considerando il protocollo disponibile in letteratura per il differenziamento verso neuroni striatali già preso in considerazione (Ma et al., 2012), i neuroni terminalmente differenziati in questo caso non hanno mostrato potenziali d'azione ripetitivi, nessuna corrente indotta dal GABA e modulazione indotta dalla dopamina. Il potenziale d'azione mostrato è abortivo e le proprietà elettrofisiologiche analizzate sono attribuibili genericamente a qualunque sottotipo neurale e non specificatamente a quello striatale.

A nostra conoscenza, il protocollo sviluppato e descritto in questo lavoro di Tesi è il primo che permette il differenziamento di cellule PS verso neuroni MSNs caratterizzati, tramite la combinazione di segnali estrinseci e molecole induttive. Inoltre, un punto critico di questo lavoro è stata una profonda analisi delle diverse fasi del differenziamento, approccio necessario da considerare per utilizzare cellule differenziate da PS come piattaforma per studi meccanicistici e approcci di *drug-screening*.

Inoltre, in questo lavoro di Tesi, è stata presentata per la prima volta un'analisi di espressione genica, mediante *microarray*, di colture striatali derivate da cellule PS. Analizzando i risultati dell'analisi di *gene ontology* è emerso l'arricchimento trascrizionale di diverse classi geniche legate al "neuronal differentiation", al "forebrain development" e al "neuron projection morphogenesis", già evidenziate in una recente analisi delle dinamiche spazio-temporali del trascrittoma del cervello umano (Kang et al., 2011). Possiamo quindi concludere che i cambiamenti trascrizionali osservati *in vitro* in seguito all'applicazione del nostro protocollo, presentano delle similitudini con quelli osservati nello sviluppo del telencefalo umano.

In questo lavoro abbiamo anche valutato la capacità dei precursori striatali derivati da cellule hES di sopravvivere e differenziare nel cervello di ratto lesionato con QA, un modello animale di HD. Risultati preliminari hanno indicato un'eccellente capacità di sopravvivenza e la formazione di proiezioni assonali, suggerendo l'integrazione delle cellule nel *network* neurale del cervello dell'animale. Sebbene le cellule trapiantate siano state in grado di integrarsi funzionalmente e di ridurre l'asimmetria motoria nel modello utilizzato, rimane comunque ancora necessario ottimizzare sotto diversi punti di vista l'esperimento di trapianto. Nonostante questi primi esperimenti *in vivo* ci abbiano permesso di individuare finestre temporali di differenziamento adeguate per permettere la

sopravvivenza e la maturazione dei progenitori striatali trapiantati, rimane necessario ottimizzare il processo. Bisogna però considerare che, per migliorare il successo del trapianto è necessario ottimizzare il protocollo di differenziamento *in vitro* e selezionare una popolazione candidata per il trapianto più omogenea e priva il più possibile di cellule proliferanti o maggiormente prona a maturare *in vivo*. A questo scopo sono disponibili diverse strategie, quali ad esempio:

- esperimenti di *sorting* per marcatori di superficie post-mitotici, che permettono di selezionare e arricchire popolazioni cellulari omogenee e maggiormente differenziate che dopo trapianto siano potenzialmente in grado di integrarsi e maturare evitando iperproliferazione di progenitori.
- Generazione di linee *reporter* tipo-cellulare-specifiche, che permetterebbero di monitorare l'espressione genica di marcatori striatali durante il differenziamento. Un approccio di questo tipo permetterebbe di selezionare poi popolazioni cellulari adeguatamente indirizzate verso il *lineage* striatale, che una volta trapiantate dovrebbero differenziare omogeneamente seguendo il *commitment* assunto *in vitro*. Ad oggi non sono disponibili linee di cellule hES *reporter* per marcatori striatali, ma nel nostro laboratorio sono attualmente in corso esperimenti per la generazione di linee cellulari di hES *reporter* per *GSX2* e *DARPP-32*, tramite l'utilizzo del *bacterial artificial chromosome* (BAC). Questo tipo di metodica, nonostante comporti difficoltà tecniche e ancora bassa efficienza di successo, permette l'inserzione di estese porzioni di DNA, tra cui i diversi elementi regolatori di un gene permettendone un'espressione più fedele a quella riscontrata *in vivo*. L'ottimizzazione di queste strategie consentirebbe non solo di migliorare l'esito del trapianto, ma anche di potenziare l'efficacia del differenziamento *in vitro*, escludendo cellule contaminanti che potrebbero rallentare o deviare il processo.
- L'ulteriore problematica della lunghezza temporale del protocollo può essere risolta tramite l'utilizzo di molecole in grado di bloccare la proliferazione e accelerare il differenziamento, come ad esempio gli inibitori della γ -secretasi. Il DAPT, molecola utilizzata con successo nella recente pubblicazione (Kriks et al., 2011), è attualmente impiegata nel nostro protocollo,

Un elemento particolarmente dibattuto è la capacità di diverse linee di differenziare con efficienza simile, nonché la riproducibilità di protocolli di differenziamento su diverse linee di cellule hES e di cellule hiPS. In questo lavoro è stato ampiamente dimostrato come si ottenga un'efficienza di differenziamento comparabile applicando lo stesso protocollo a due diverse linee di cellule hES e a una linea di cellule hiPS. Ciò offre delle garanzie per l'impiego del protocollo messo a punto come

un *tool* valido e robusto anche per la generazione di modelli malattia basati su cellule iPS.

Generazione di un modello malattia, attraverso la generazione di cellule iPS da pazienti affetti da HD

In questo lavoro di Tesi sono state generate diverse linee di cellule di HD-iPS a partire da tre pazienti, di cui due con un raro aplotipo omozigote. E' stato dimostrato come sia possibile derivare linee di cellule iPS sia da pazienti eterozigoti che omozigoti, espandibili e in grado di differenziare verso tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti germinativi e verso neuroni. Ciò ha permesso di verificare come la mutazione e la presenza di due alleli mutati non infici il processo di riprogrammazione e il differenziamento neurale. Le linee di HD-iPS sono state generate tramite l'uso di 3 o 4 fattori di riprogrammazione, e in entrambi i casi il processo è stato efficiente. Inoltre non sono state identificate differenze nell'espressione di marcatori di pluripotenza, nella morfologia delle colonie o nel *rate* di crescita. Anche in seguito a differenziamento neurale il comportamento tra le linee generate con 3 o 4 fattori è stato simile.

Considerando i criteri necessari per definire la pluripotenza questi sono stati ampiamenti soddisfatti, come dimostrato dalla formazione di teratoma *in vivo*. I teratomi, i teratocarcinomi e i tumori del sacco vitellino sono abbastanza comuni nell'uomo; spesso si presentano in individui giovani e in bambini. Spesso questi tipi di formazioni contengono strutture simili a quelle del sacco vitellino (Almstrup et al., 2007; Pierce et al., 1970; Prevedello et al., 2007). In questo lavoro è stata osservata per la prima volta la formazione di teratoma contenenti tessuto di sacco vitellino a partire da cellule iPS, in seguito a trapianto di cellule hiPS in topi immunocompressi.

L'instabilità del tratto CAG è un fenomeno ben documentato nei gameti affetti da HD. Questo evento può causare l'anticipazione della malattia nella generazione successiva (Pearson et al., 2005) (Yoon et al., 2003). L'instabilità del tratto CAG è stata anche osservata nei linfoblasti, quando l'espansione del tratto CAG supera le 60 ripetizioni (Cannella et al., 2009), ma anche in cellule somatiche ed in particolare in neuroni post-mitotici murini (Dragileva et al., 2009; Gonitel et al., 2008), ed in neuroni cerebrali umani (Kennedy et al., 2003). Sebbene non sia stata osservata nessuna instabilità del tratto CAG in tessuto fetale HD (Benitez et al., 1995), è stato comunque verificato che il processo di riprogrammazione non inficiasse la lunghezza del tratto ripetuto (Park et al., 2008; Zhang et al., 2010a). Inoltre, non è stato osservato nessun cambiamento anche dopo diversi passaggi in coltura, fino a 40. Questi risultati sono in accordo con i dati osservati in modelli cellulari di HD basati su hES (Niclis et al., 2009; Seriola et al., 2011). Successivamente, abbiamo verificato la grandezza del tratto CAG anche in seguito a differenziamento neurale. Al giorno 30 del

differenziamento, quando approssimativamente il 15-30% delle cellule ha assunto un fenotipo neurale, in tutte le quattro linee di HD-iPS omozigoti analizzate è stata identificata una delezione di due triplette su un allele. Seriola e collaboratori non hanno osservato differenze nell'espansione del tratto CAG nelle linee di HD-ES eterozigoti (Seriola et al., 2011); tuttavia, un altro studio ha riportato un basso livello di instabilità in neurosfere derivate da due linee di HD-hES, con un'espansione di 5 ripetizioni del CAG (Nielis et al., 2009). In uno studio recente (Consortium., 2012) è stata però riportata un'espansione del tratto CAG in condizione di proliferazione di cellule staminali neurali derivate da una linea di HD-iPS. L'espansione sembra associata ad una maggiore lunghezza del tratto CAG, in quanto linee cellulari derivate in modo analogo, ma con un tratto CAG più corto non hanno mostrato instabilità (Consortium., 2012).

D'altra parte, considerando la propensione al differenziamento neurale, è stata osservata variabilità nell'efficienza di differenziamento tra le diverse linee. Un'analisi del comportamento di tutte le linee di HD-iPS, incluse le quattro derivate dalla stessa linea di fibroblasti, ha evidenziato come la variabilità sia intrinseca delle linee di cellule iPS (derivate da diverse linee di fibroblasti), o addirittura dei singoli cloni di cellule iPS (derivati dalla stessa linea di fibroblasti), non riflettendo nessun ruolo della mutazione del tratto CAG. La variabilità osservata tra le linee è compatibile con le recenti osservazioni sulla propensione innata al differenziamento delle diverse linee di cellule hES e hiPS (Hu et al., 2010; Kim et al., 2010; Osafune et al., 2008). In uno studio recente è stato identificato il miR-371-3 come un marcatore predittivo della propensione al differenziamento neurale (Kim et al., 2011), il cui livello di espressione è inversamente correlato alla propensione al differenziamento neurale. Ciò potrebbe essere utilizzato per selezionare linee potenzialmente differenziabili *in vitro*.

Nonostante l'intrinseca variabilità fra i cloni di cellule iPS, sia le linee WT-iPS che HD-iPS hanno mostrato capacità di differenziare verso un destino telencefalico (cellule *SIX3* e *FOXG1* positive), e ulteriormente verso la *lineage* striatale (cellule *GAD65/67*, *ARPP-21* e *DARPP-32* positive). Queste analisi non hanno rivelato differenze di comportamento tra le linee di cellule WT o HD, dimostrando come la mutazione non infici la maturazione neurale, in accordo con il fatto che individui omozigoti per la mutazione nascono asintomatici (Squitieri et al., 2003). Questa evidenza è però in contrasto con quanto descritto in un altro lavoro (Molero et al., 2009) in cui sono invece presentate alterazioni nella specificazione neurale. Attualmente questo è un punto particolarmente dibattuto presentando ancora dei dati contrastanti.

Tra i diversi fenotipi molecolari legati all'HD, è stato descritto un incremento del processo di

autofagia nei cervelli murini di modelli HD. Ciò causa una compromissione, nel lungo tempo, del sistema di *clearance* di proteine tossiche (Martinez-Vicente et al., 2010). Nel modello descritto in questo lavoro di Tesi, è stata osservata una maggiore attivazione dei lisosomi nelle linee di HD-iPS rispetto ai controlli, sia in condizione di *self-renewal* che in differenziamento. Ciò è stato accompagnato da un aumento dei compartimenti acidi subcellulari, suggerendo un attivo processo di degradazione proteica. Questo processo potrebbe contribuire a preservare lo stato dei neuroni *in vitro*. Ciò potrebbe essere un iniziale tentativo di difesa della cellula verso la tossicità causata dagli aggregati di HTT mutata. A lungo termine si pensa però che l'*over*-attivazione lisosomiale possa contribuire ulteriormente alla tossicità cellulare, dovuta all'ingolfamento del sistema lisosomiale-autofagico.

Collettivamente, queste osservazioni suggeriscono che le linee cellulari di HD-iPS generate sono in grado di replicare, *in vitro*, alcuni fenotipi molecolari e biologici tipicamente osservati nella patologia, mantenendo la loro capacità di generare neuroni. Soprattutto, è emerso dall'intero lavoro come sia fondamentale, in studi *in vitro* di generazione di modelli malattia, analizzare e considerare molteplici cloni di una stessa linea di cellule iPS, in quanto è presente una forte componente di variabilità intrinseca *inter-clone*. Ciò potrebbe mascherare o esasperare fenotipi legati alla malattia. A questo scopo è necessario validare ulteriori fenotipi su diversi cloni e su diverse linee.

Considerate queste evidenze, in futuro questa tecnologia rivoluzionaria potrebbe rappresentare un valido sistema per la generazione di modelli malattia, fornendo una piattaforma da utilizzare per studi di *drug-screening* e per l'identificazione di potenziali target farmacologici associati all'HD. Inoltre, è necessario sottolineare l'importanza di aver sviluppato un nuovo e robusto protocollo per il differenziamento diretto di cellule pluripotenti verso neuroni striatali. Grazie a questo avanzamento metodologico, ora è possibile esporre le cellule HD-iPS generate ad un metodo validato per convertirle verso neuroni striatali ben caratterizzati, in modo da poter confermare/validare i fenotipi associati alla malattia già evidenziati.

Bibliografia

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* *26*, 1276-1284.
- Almstrup, K., Leffers, H., Lothe, R.A., Skakkebaek, N.E., Sonne, S.B., Nielsen, J.E., Rajpert-De Meyts, E., and Skotheim, R.I. (2007). Improved gene expression signature of testicular carcinoma in situ. *Int J Androl* *30*, 292-302; discussion 303.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* *278*, 474-476.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* *321*, 699-702.
- Appolloni, I., Calzolari, F., Corte, G., Perris, R., and Malatesta, P. (2008). Six3 controls the neural progenitor status in the murine CNS. *Cereb Cortex* *18*, 553-562.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Jabaudon, D., Yoshida, Y., and Macklis, J.D. (2008). *Ctip2* controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *J Neurosci* *28*, 622-632.
- Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 16707-16712.
- Benitez, J., Robledo, M., Ramos, C., Ayuso, C., Astarloa, R., Garcia Yebenes, J., and Brambati, B. (1995). Somatic stability in chorionic villi samples and other Huntington fetal tissues. *Hum Genet* *96*, 229-232.
- Bergstrom, R., Strom, S., Holm, F., Feki, A., and Hovatta, O. (2011). Xeno-free culture of human pluripotent stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* *767*, 125-136.
- Boland, M.J., Hazen, J.L., Nazor, K.L., Rodriguez, A.R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S., and Baldwin, K.K. (2009). Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* *461*, 91-94.
- Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M.K., Vriend, G., and Scholer, H.R. (1998). New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes & development* *12*, 2073-2090.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* *2*, 151-159.
- Cannella, M., Maglione, V., Martino, T., Ragona, G., Frati, L., Li, G.M., and Squitieri, F. (2009). DNA instability in replicating Huntington's disease lymphoblasts. *BMC Med Genet* *10*, 11.
- Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 157-162.
- Caricasole, A.A., van Schaik, R.H., Zeinstra, L.M., Wierikx, C.D., van Gurp, R.J., van den Pol, M., Looijenga, L.H., Oosterhuis, J.W., Pera, M.F., Ward, A., *et al.* (1998). Human growth-differentiation factor 3 (hGDF3): developmental regulation in human teratocarcinoma cell lines and expression in primary testicular germ cell tumours. *Oncogene* *16*, 95-103.

- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643-655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* *450*, 1230-1234.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* *27*, 275-280.
- Chen, G., Gulbranson, D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Smuga-Otto, K., Howden, S.E., Diol, N.R., Propson, N.E., *et al.* (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* *8*, 424-429.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* *383*, 407-413.
- Consortium, H.i. (2012). Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* *11*, 264-278.
- Danjo, T., Eiraku, M., Muguruma, K., Watanabe, K., Kawada, M., Yanagawa, Y., Rubenstein, J.L., and Sasai, Y. (2011). Subregional specification of embryonic stem cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatory treatment with extrinsic signals. *J Neurosci* *31*, 1919-1933.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* *90*, 537-548.
- Deacon, T.W., Pakzaban, P., and Isacson, O. (1994). The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res* *668*, 211-219.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* *321*, 1218-1221.
- Ding, L., Paszkowski-Rogacz, M., Nitzsche, A., Slabicki, M.M., Heninger, A.K., de Vries, I., Kittler, R., Junqueira, M., Shevchenko, A., Schulz, H., *et al.* (2009). A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity. *Cell Stem Cell* *4*, 403-415.
- Dottori, M., and Pera, M.F. (2008). Neural differentiation of human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ *438*, 19-30.
- Dragileva, E., Hendricks, A., Teed, A., Gillis, T., Lopez, E.T., Friedberg, E.C., Kucherlapati, R., Edelman, W., Lunetta, K.L., MacDonald, M.E., *et al.* (2009). Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes. *Neurobiol Dis* *33*, 37-47.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* *457*, 277-280.
- Echevarria, D., Vieira, C., Gimeno, L., and Martinez, S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain research* *43*, 179-191.

- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., *et al.* (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* *1*, 568-577.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes & development* *22*, 152-165.
- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* *41*, 968-976.
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *26*, 2467-2474.
- Ericson, J., Muhr, J., Jessell, T.M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. *The International journal of developmental biology* *39*, 809-816.
- Ericsson, J., Silberberg, G., Robertson, B., Wikstrom, M.A., and Grillner, S. (2011). Striatal cellular properties conserved from lampreys to mammals. *J Physiol* *589*, 2979-2992.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154-156.
- Follenzi, A., and Naldini, L. (2002). Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol* *346*, 454-465.
- Fox, J.H., Connor, T., Chopra, V., Dorsey, K., Kama, J.A., Bleckmann, D., Betschart, C., Hoyer, D., Frentzel, S., Difiglia, M., *et al.* (2010). The mTOR kinase inhibitor Everolimus decreases S6 kinase phosphorylation but fails to reduce mutant huntingtin levels in brain and is not neuroprotective in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Molecular neurodegeneration* *5*, 26.
- Fuccillo, M., Rallu, M., McMahon, A.P., and Fishell, G. (2004). Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning. *Development (Cambridge, England)* *131*, 5031-5040.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy* *85*, 348-362.
- Gammill LS, B.-F.M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* *4*, 795-805.
- Gaspard, N., Bouchet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Aemele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., *et al.* (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* *455*, 351-357.
- Gerrard, L., Rodgers, L., and Cui, W. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *23*, 1234-1241.
- Gonitel, R., Moffitt, H., Sathasivam, K., Woodman, B., Detloff, P.J., Faull, R.L., and Bates, G.P. (2008). DNA instability in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3467-3472.

- Graf, T. (2011). Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell* 9, 504-516.
- Gunhaga L, J.T., Edlund T. (2000). Sonic hedgehog signaling at gastrula stages specifies ventral telencephalic cells in the chick embryo. *Development* 127, 3283-3293.
- Han, S.S., Williams, L.A., and Eggan, K.C. (2011). Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Neuron* 70, 626-644.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., *et al.* (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., and Melton, D.A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-295.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M., and Wilson, S. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35, 255-265.
- Hu, B.Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.X., Zhang, X.Q., Thomson, J.A., and Zhang, S.C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4335-4340.
- Itsykson, P., Ilouz, N., Turetsky, T., Goldstein, R.S., Pera, M.F., Fishbein, I., Segal, M., and Reubinoff, B.E. (2005). Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci* 30, 24-36.
- Jiang, Z.G., and North, R.A. (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J Physiol* 443, 533-553.
- Juopperi, T.A., Song, H., and Ming, G.L. (2011). Modeling neurological diseases using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Future neurology* 6, 363-373.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19, 5720-5728.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.
- Kang, H.J., Kawasawa, Y.I., Cheng, F., Zhu, Y., Xu, X., Li, M., Sousa, A.M., Pletikos, M., Meyer, K.A., Sedmak, G., *et al.* (2011). Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478, 483-489.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., and Emson, P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18, 527-535.
- Kegel, K.B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J.G., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2000). Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 20, 7268-7278.
- Kennedy, L., Evans, E., Chen, C.M., Craven, L., Detloff, P.J., Ennis, M., and Shelbourne, P.F. (2003). Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 12, 3359-3367.
- Kim, D.S., Lee, J.S., Leem, J.W., Huh, Y.J., Kim, J.Y., Kim, H.S., Park, I.H., Daley, G.Q., Hwang, D.Y., and Kim, D.W. (2010). Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of

their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev* 6, 270-281.

Kim, H., Lee, G., Ganat, Y., Papapetrou, E.P., Lipchina, I., Socci, N.D., Sadelain, M., and Studer, L. (2011). miR-371-3 Expression Predicts Neural Differentiation Propensity in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 695-706.

Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Arauzo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., *et al.* (2009). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136, 411-419.

Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., and Brustle, O. (2009). A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3225-3230.

Kohtz, J.D., Baker, D.P., Corte, G., and Fishell, G. (1998). Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. *Development (Cambridge, England)* 125, 5079-5089.

Kreitzer, A.C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* 32, 127-147.

Kriks, S., Shim, J.W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., *et al.* (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547-551.

Laeng, P., Pitts, R.L., Lemire, A.L., Drabik, C.E., Weiner, A., Tang, H., Thyagarajan, R., Mallon, B.S., and Altar, C.A. (2004). The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. *J Neurochem* 91, 238-251.

Lagutin, O.V., Zhu, C.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H.R., McKinnon, P.J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes & development* 17, 368-379.

Lavado, A., Lagutin, O.V., and Oliver, G. (2008). Six3 inactivation causes progressive caudalization and aberrant patterning of the mammalian diencephalon. *Development (Cambridge, England)* 135, 441-450.

Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19, 7881-7888.

Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., *et al.* (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402-406.

Lee, G., and Studer, L. (2009). Modelling familial dysautonomia in human induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 2286-2296.

Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Scholer, H.R., Hayek, A., and Ding, S. (2009a). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 2992-3000.

Li, X.J., Zhang, X., Johnson, M.A., Wang, Z.B., Lavaute, T., and Zhang, S.C. (2009b). Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)* 136, 4055-4063.

Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., *et al.* (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3, 587-590.

- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.
- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., *et al.* (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38, 431-440.
- Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C.M., Colleoni, S., Lee, Y.L., Kim, K.A., Ando, D., Urnov, F.D., Galli, C., Gregory, P.D., *et al.* (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25, 1298-1306.
- Lupo, G., Harris, W.A., and Lewis, K.E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7, 103-114.
- Ma, L., Hu, B., Liu, Y., Vermilyea, S.C., Liu, H., Gao, L., Sun, Y., Zhang, X., and Zhang, S.C. (2012). Human Embryonic Stem Cell-Derived GABA Neurons Correct Locomotion Deficits in Quinolinic Acid-Lesioned Mice. *Cell Stem Cell*.
- Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3, 843-853.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 595-605.
- Manuel, M., Martynoga, B., Yu, T., West, J.D., Mason, J.O., and Price, D.J. (2010). The transcription factor Foxg1 regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice. *Development (Cambridge, England)* 137, 487-497.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., *et al.* (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* 13, 567-576.
- Marullo, M., Zuccato, C., Mariotti, C., Lahiri, N., Tabrizi, S.J., Di Donato, S., and Cattaneo, E. (2010). Expressed Alu repeats as a novel, reliable tool for normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *Genome Biol* 11, R9.
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., *et al.* (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21, 503-511.
- Mauri, M., Lentini, D., Gravati, M., Foudah, D., Biella, G., Costa, B., Toselli, M., Parenti, M., and Coco, S. (2012). Mesenchymal stem cells enhance GABAergic transmission in co-cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 49, 395-405.
- Mikkelsen TS, H.J., Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55.
- Mitsui K, T.Y., Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 1132.
- Molero, A.E., Gokhan, S., Gonzalez, S., Feig, J.L., Alexandre, L.C., and Mehler, M.F. (2009). Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of

- Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21900-21905.
- Munoz-Sanjuan, I., and Brivanlou, A.H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* 3, 271-280.
- Nat, R., and Dechant, G. (2011). Milestones of directed differentiation of mouse and human embryonic stem cells into telencephalic neurons based on neural development in vivo. *Stem Cells Dev* 20, 947-958.
- Niclis, J.C., Trounson, A.O., Dottori, M., Ellisdon, A.M., Bottomley, S.P., Verlinsky, Y., and Cram, D.S. (2009). Human embryonic stem cell models of Huntington disease. *Reprod Biomed Online* 19, 106-113.
- Niederreither, K., and Dolle, P. (2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9, 541-553.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401-413.
- Nieuwkoop, P.D. (1952). Activation and organization of the central nervous system in amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 120, 33-81.
- Nisenbaum, E.S., Wilson, C.J., Foehring, R.C., and Surmeier, D.J. (1996). Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 76, 1180-1194.
- Nordstrom, U., Jessell, T.M., and Edlund, T. (2002). Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* 5, 525-532.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.
- Olsson, M., Campbell, K., Wictorin, K., and Bjorklund, A. (1995). Projection neurons in fetal striatal transplants are predominantly derived from the lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* 69, 1169-1182.
- Onorati, M., Binetti, M., Conti, L., Camnasio, S., Calabrese, G., Albieri, I., Di Febo, F., Toselli, M., Biella, G., Martynoga, B., *et al.* (2011). Preservation of positional identity in fetus-derived neural stem (NS) cells from different mouse central nervous system compartments. *Cell Mol Life Sci* 68, 1769-1783.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C.A., Chien, K.R., and Melton, D.A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26, 313-315.
- Ouimet, C.C., Langley-Gullion, K.C., and Greengard, P. (1998). Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. *Brain Res* 808, 8-12.
- Ouimet, C.C., Miller, P.E., Hemmings, H.C., Jr., Walaas, S.I., and Greengard, P. (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J Neurosci* 4, 111-124.
- Pankratz, M.T., Li, X.J., Lavaute, T.M., Lyons, E.A., Chen, X., and Zhang, S.C. (2007). Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 1511-1520.
- Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherli, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C.,

- Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.
- Patani, R., Compston, A., Puddifoot, C.A., Wyllie, D.J., Hardingham, G.E., Allen, N.D., and Chandran, S. (2009). Activin/Nodal inhibition alone accelerates highly efficient neural conversion from human embryonic stem cells and imposes a caudal positional identity. *PLoS One* 4, e7327.
- Pearson, C.E., Nichol Edamura, K., and Cleary, J.D. (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6, 729-742.
- Pera, M.F., Andrade, J., Houssami, S., Reubinoff, B., Trounson, A., Stanley, E.G., Ward-van Oostwaard, D., and Mummery, C. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci* 117, 1269-1280.
- Pera, M.F., Filipczyk, A.A., Hawes, S.M., and Laslett, A.L. (2003). Isolation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 365, 429-446.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-12548.
- Pickering, S.J., Minger, S.L., Patel, M., Taylor, H., Black, C., Burns, C.J., Ekonomou, A., and Braude, P.R. (2005). Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 10, 390-397.
- Pierce, G.B., Bullock, W.K., and Huntington, R.W., Jr. (1970). Yolk sac tumors of the testis. *Cancer* 25, 644-658.
- Prevedello, D.M., Kassam, A.B., Carrau, R.L., Snyderman, C.H., Thomas, A., Gardner, P., Mintz, A., Vecchione, L., and Losee, J. (2007). Transpalatal endoscopic endonasal resection of a giant epignathus skull base teratoma in a newborn. Case report. *J Neurosurg* 107, 266-271.
- Ravikumar, B., and Rubinsztein, D.C. (2006). Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin: a step towards therapy? *Mol Aspects Med* 27, 520-527.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., *et al.* (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585-595.
- Rogers, M.B., Hosler, B.A., and Gudas, L.J. (1991). Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development (Cambridge, England)* 113, 815-824.
- Saporta, M.A., Grskovic, M., and Dimos, J.T. (2011). Induced pluripotent stem cells in the study of neurological diseases. *Stem cell research & therapy* 2, 37.
- Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P.G., Young, A.B., Penney, J., Vonsattel, J.P., Aronin, N., and DiFiglia, M. (1997). Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 42, 604-612.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., *et al.* (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473-477.
- Sasai, Y., and De Robertis, E.M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Developmental*

biology *182*, 5-20.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., and De Robertis, E.M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* *79*, 779-790.

Scotting, P.J., Walker, D.A., and Perilongo, G. (2005). Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nature reviews* *5*, 481-488.

Seriola, A., Spits, C., Simard, J.P., Hilven, P., Haentjens, P., Pearson, C.E., and Sermon, K. (2011). Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. *Hum Mol Genet* *20*, 176-185.

Shen, W., Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Held, J.E., and Surmeier, D.J. (2004). Kv1.2-containing K⁺ channels regulate subthreshold excitability of striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol* *91*, 1337-1349.

Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P., and Livesey, F.J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci* *15*, 477-486, S471.

Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* *113*, 685-700.

Shimamura, K., and Rubenstein, J.L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development (Cambridge, England)* *124*, 2709-2718.

Smith, A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology* *17*, 435-462.

Smith, W.C., and Harland, R.M. (1992). Expression cloning of *noggin*, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* *70*, 829-840.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., *et al.* (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* *136*, 964-977.

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

Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *27*, 543-549.

Squitieri, F., Gellera, C., Cannella, M., Mariotti, C., Cislighi, G., Rubinsztein, D.C., Almqvist, E.W., Turner, D., Bachoud-Levi, A.C., Simpson, S.A., *et al.* (2003). Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* *126*, 946-955.

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* *136*, 364-377.

Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* *18*, 890-894.

Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2011). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development* *24*, 2239-2263.

- Stern, C.D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2, 92-98.
- Surmeier, D.J., Bargas, J., and Kitai, S.T. (1989). Two types of A-current differing in voltage-dependence are expressed by neurons of the rat neostriatum. *Neurosci Lett* 103, 331-337.
- Surmeier, D.J., Stefani, A., Foehring, R.C., and Kitai, S.T. (1991). Developmental regulation of a slowly-inactivating potassium conductance in rat neostriatal neurons. *Neurosci Lett* 122, 41-46.
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., and Rubenstein, J.L. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development (Cambridge, England)* 126, 3359-3370.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tao, W., and Lai, E. (1992). Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* 8, 957-966.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Torres, E.M., Dowd, E., and Dunnett, S.B. (2008). Recovery of functional deficits following early donor age ventral mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 154, 631-640.
- Unger, C., Gao, S., Cohen, M., Jaconi, M., Bergstrom, R., Holm, F., Galan, A., Sanchez, E., Irion, O., Dubuisson, J.B., *et al.* (2009). Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod* 24, 2567-2581.
- Urbach, A., Schuldiner, M., and Benvenisty, N. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22, 635-641.
- Utikal J, M.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.
- Valenzuela, D.M., Economides, A.N., Rojas, E., Lamb, T.M., Nunez, L., Jones, P., Lp, N.Y., Espinosa, R., 3rd, Brannan, C.I., Gilbert, D.J., *et al.* (1995). Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15, 6077-6084.
- Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R.A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118, 4495-4509.
- Vieira, C., Pombero, A., Garcia-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., and Martinez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *The International journal of developmental biology* 54, 7-20.
- Wang, H.F., and Liu, F.C. (2001). Developmental restriction of the LIM homeodomain transcription factor Islet-1 expression to cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 103, 999-1016.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., *et al.* (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of

human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618-630.

Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watanabe, Y., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8, 288-296.

Wernig M, M.A., Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.

Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development (Cambridge, England)* 128, 3759-3771.

Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.

Xu, Q., Guo, L., Moore, H., Waclaw, R.R., Campbell, K., and Anderson, S.A. (2010). Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron* 65, 328-340.

Yoon, S.R., Dubeau, L., de Young, M., Wexler, N.S., and Arnheim, N. (2003). Huntington disease expansion mutations in humans can occur before meiosis is completed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8834-8838.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

Yu, W., Wang, Y., McDonnell, K., Stephen, D., and Bai, C.B. (2009). Patterning of ventral telencephalon requires positive function of Gli transcription factors. *Developmental biology* 334, 264-275.

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

Zhang, N., An, M.C., Montoro, D., and Ellerby, L.M. (2010a). Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Curr* 2, RRN1193.

Zhang, S.C. (2006). Neural subtype specification from embryonic stem cells. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 16, 132-142.

Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1129-1133.

Zhang, X., Huang, C.T., Chen, J., Pankratz, M.T., Xi, J., Li, J., Yang, Y., Lavaute, T.M., Li, X.J., Ayala, M., *et al.* (2010b). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell* 7, 90-100.

Zhao, X.Y., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C.L., Ma, Q.W., Wang, L., *et al.* (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461, 86-90.

Zhou, J., Su, P., Li, D., Tsang, S., Duan, E., and Wang, F. (2010). High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28, 1741-1750.

Zhou W, F.C. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2667-2674.

Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev* 90, 905-981.

Zynger, D.L., McCallum, J.C., Luan, C., Chou, P.M., and Yang, X.J. (2010). Glypican 3 has a higher sensitivity than alpha-fetoprotein for testicular and ovarian yolk sac tumour: immunohistochemical investigation with analysis of histological growth patterns. *Histopathology* 56, 750-757.