

PROGETTO MOOD

Progress Report 2014

INTRODUZIONE

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), prodotte per la prima volta nel 2006 dal gruppo di Shinya Yamanaka presso l'Università di Kyoto, rappresentano un importante passo in avanti nel campo della ricerca sulle cellule staminali. Le iPS, infatti, sono un tipo di cellule staminali pluripotenti artificialmente derivate da una cellula non-pluripotente (in genere una cellula somatica adulta) mediante l'espressione "forzata" di specifici geni. Questa metodica ha aperto un nuovo scenario in quanto permette di ottenere cellule staminali pluripotenti, importanti per la ricerca e potenzialmente per la terapia, senza ricorrere all'uso di cellule staminali derivate da embrioni umani.

Le cellule iPS vengono generate mediante trasduzione di particolari geni associati alle cellule staminali, all'interno di cellule non pluripotenti, come ad esempio i fibroblasti adulti. La trasduzione è normalmente ottenuta attraverso vettori virali, quali lentivirus o retrovirus. I geni trasdotti includono regolatori trascrizionali, come Oct-3/4, Klf4, c-Myc e Sox2.

Poiché questa nuova metodica, non solo permette di studiare i meccanismi molecolari e biologici alla base delle malattie, ma anche di pensare ad una personalizzazione della terapia o addirittura alla medicina rigenerativa, l'obiettivo del progetto MOOD è di produrre e utilizzare cellule iPS ottenute da donne sane e da donne con depressione ricorrente familiare e di differenziarle in neuroni al fine di studiare le basi fisiopatologiche della malattia e di identificare nuovi target per il trattamento farmacologico.

Durante la prima fase del progetto, in collaborazione con il Prof. Gennarelli, sono stati prelevati fibroblasti da individui sani e riprogrammati a cellule iPS mediante infezione con i vettori lentivirali veicolanti i geni Oct-3/4, Klf4, c-Myc e Sox2.

Le cellule ottenute sono state completamente caratterizzate valutando l'espressione di specifici marcatori di staminalità e pluripotenza. In particolare, l'analisi microscopica ha confermato la presenza di colonie di cellule dalle caratteristiche fenotipiche di staminalità, come l'alta densità cellulare, bordi netti e rifrangenti e la capacità di auto rigenerazione. L'analisi, effettuata mediante immunofluorescenza, ha confermato l'espressione di geni tipici staminali come SOX2, Oct4, Nanog, TRA-1-60 e TRA-1-81.

In collaborazione con la Dott.ssa Piovani della Sezione di Genetica dell'Università di Brescia, le cellule iPS ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista genetico al fine di escludere grosse mutazioni o alterazioni cromosomiche. Infine, lo studio *in vitro* della capacità delle cellule iPS di differenziare nei tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma) ha permesso di determinare l'effettiva pluripotenza delle cellule generate.

La seconda fase del progetto è stata dedicata alla messa a punto dei protocolli per il differenziamento delle cellule iPS in neuroni dopaminergici. Con questi protocolli è stato possibile generare neuroni dopaminergici trattando le cellule iPS con un cocktail di fattori di crescita somministrato a tempi diversi per circa 80 giorni.

I neuroni ottenuti sono stati caratterizzati sia dal punto di vista molecolare che dal punto di vista biochimico/funzionale rivelando proprietà tipiche dei neuroni dopaminergici e comparabili a quanto già ampiamente descritto sui modelli di cellule primarie derivate da topo.

RISULTATI

1. Caratterizzazione fenotipica ed analisi del cariotipo delle cellule iPS

I fibroblasti di individui sani sono stati riprogrammati a cellule iPS mediante infezione lentivirale dei 4 fattori di Yamanaka (Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc) con un metodo doxiciclina-inducibile. Tale metodo è un sistema di espressione genica nella quale la trascrizione dei geni è attivata o disattivata in modo reversibile in presenza dell'antibiotico doxiciclina. L'utilizzo di questo sistema permette di controllare l'espressione dei 4 transgeni durante il processo di riprogrammazione e di selezionare le colonie correttamente riprogrammate. Infatti, dopo la sospensione dell'antibiotico doxiciclina, solo le colonie correttamente riprogrammate sono in grado di sopravvivere mentre le colonie non riprogrammate vanno incontro a degenerazione.

Dopo 30 giorni di trattamento con doxiciclina, è stato possibile osservare l'insorgenza di colonie con morfologia tipica staminale (Fig. 1B). Pertanto il trattamento con doxiciclina è stato sospeso e dopo circa due settimane, le colonie che risultavano avere una morfologia tipica staminale, ovvero bordi netti e traslucidi, alta densità cellulare e che potevano sopravvivere in assenza di doxiciclina, sono state manualmente prelevate ed espanse.

Le cellule iPS ottenute sono in grado di crescere autonomamente e vengono coltivate in adesione secondo i protocolli standard per la coltivazione delle cellule staminali embrionali.

I cloni isolati sono stati completamente caratterizzati per l'espressione di marcatori di staminalità (Fig. 1A). Inoltre, poiché le alterazioni cromosomiche durante la riprogrammazione sono un evento frequente, è stata effettuata l'analisi del cariotipo dei cloni ottenuti. Nel 90% dei casi il cariotipo è risultato essere normale, ovvero presentava 22 coppie di cromosomi più la coppia dei cromosomi sessuali femminili XX [46;XX] (Fig. 1C), mentre un 10% dei cloni analizzati ha presentato un cariotipo alterato, ovvero 22 coppie di cromosomi più una trisomia dei cromosomi sessuali femminili XXX [47;XXX]. I cloni con cariotipo alterato sono stati esclusi dai successivi esperimenti.

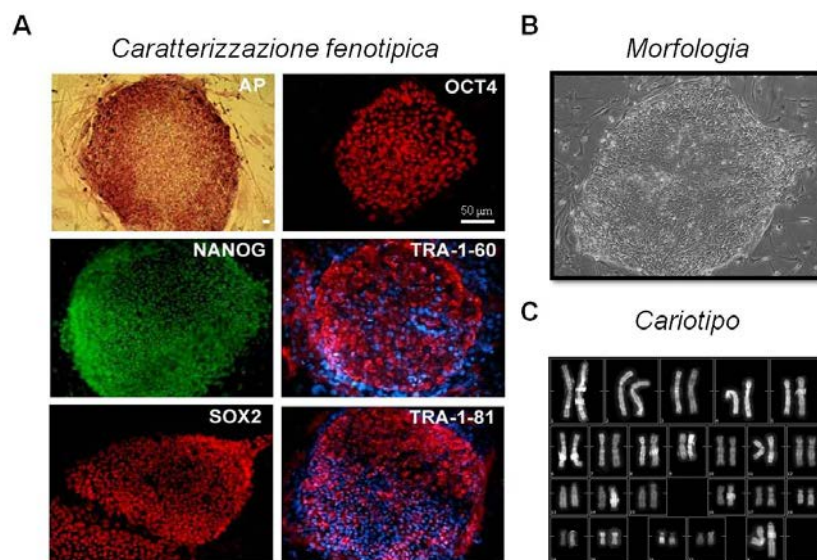


Fig. 1: Analisi dei marcatori di pluripotenza e del cariotipo delle cellule iPS dopo 5 giorni di cultura. (A) Immagini rappresentative di colonie iPS analizzate per i marcatori di staminalità: fosfatasi alcalina (AP), OCT4, NANOG, TRA-1-60, SOX2 e TRA-1-81. (B) Immagine rappresentativa di una colonia iPS con morfologia tipica staminale (C) Il cariotipo delle colonie analizzate è risultato essere normale [46; XX].

Per determinare la capacità differenziativa e l'effettiva pluripotenza delle colonie iPS ottenute, sono stati generati i cosiddetti embryoid-bodies (EBs), strutture sferiche che si formano dopo circa 7 giorni di cultura in sospensione delle cellule iPS. Gli EBs sono stati successivamente trasferiti in apposite piastre e lasciati aderire e crescere per altri 8 giorni. Le cellule spontaneamente differenziate hanno mostrato vari tipi di morfologie e dall'analisi immunocitochimica è stato possibile confermare la presenza di diversi tipi

cellulari di derivazione ectodermica, mesodermica e endodermica confermando la potenzialità differenziativa di queste cellule (Fig. 2)

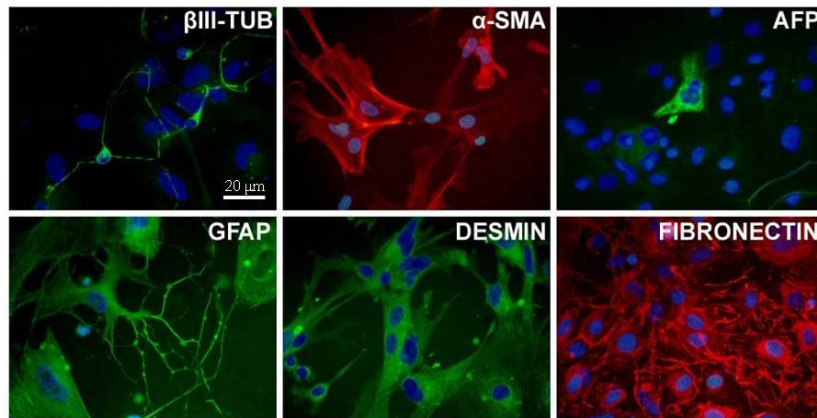


Fig. 2: Test di pluripotenza delle cellule iPS derivate da fibroblasti umani. L'analisi, eseguita mediante immunofluorescenza, ha confermato la capacità delle cellule iPS di differenziare in popolazioni derivate dai tre foglietti embrionali: BIII-tubulin e GFAP (ectoderma), SMA e Desmin (mesoderma), AFP e Fibronectin (endoderma). I nuclei sono visualizzati mediante colorazione con DAPI. Scale Barr=20μm

2. Differenziamento di cellule iPS in neuroni dopaminergici

I protocolli utilizzati per il differenziamento neuronale sono stati riadattati dai protocolli pubblicati in letteratura dal gruppo di ricerca di L. Studer dell'Università di New York (Kriks et al., 2011) (Fig. 3). In questo lavoro le cellule iPS sono state differenziate verso un fenotipo neuronale inibendo le vie intracellulari del segnale di specifici fattori di crescita, quali ad esempio quella mediata dal fattore di crescita TGFβ e dalla proteina morfogenetica dell'osso (BMP), e successivamente esponendo le cellule all'azione differenziante di molecole necessarie per l'acquisizione del fenotipo dopaminergico, quali Shh e FGF8b.

Pertanto, le colonie iPS ottenute dai fibroblasti di pazienti sani sono state dissociate a singole cellule e messe in cultura utilizzando un terreno specifico addizionato con LDN93189 e SB431542, due molecole che inibiscono le vie del TGFβ e di BMP e che promuovono l'efficienza dell'induzione neuronale.

Il fenotipo dopaminergico è stato indotto precocemente, a partire dal primo giorno di differenziamento, mediante l'aggiunta di Shh e FGF8b nel terreno di cultura. La maturazione dei neuroni dopaminergici è stata quindi proseguita mantenendo le cellule in un terreno neuronale con l'aggiunta di un cocktail di fattori di crescita di fondamentale

importanza per il mantenimento e la maturazione del fenotipo dopaminergico, ovvero il fattore neurotrofico BDNF, il fattore neurotrofico GDNF, il fattore di crescita TGF β , AMP ciclico e acido ascorbico.

Dopo circa 20 giorni di differenziamento le cellule sono state meccanicamente isolate e ripiastrate in co-cultura con astrociti corticali murini che forniscono un supporto stromale e permettono di mantenere i neuroni in cultura per lunghi periodi, fino a completa maturazione.

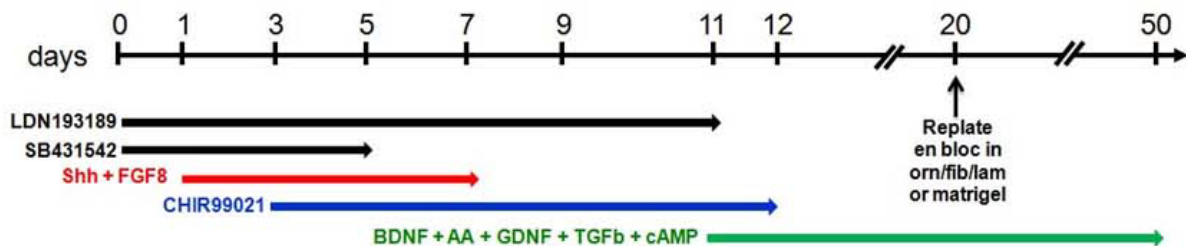


Fig. 3: Protocollo utilizzato per il differenziamento di cellule hiPSC in neuroni dopaminergici. Linea temporale e condizioni di cultura per il differenziamento delle cellule iPS in neuroni dopaminergici mesencefalici.

L'analisi in immunofluorescenza, eseguita durante il differenziamento neuronale, ha permesso di controllare l'espressione di specifici marcatori in ogni fase del processo differenziativo. Le immagini mostrano che all'11° giorno di differenziamento si osserva l'espressione della proteina PAX6, marcatore dei progenitori neuronali, e della proteina LMX1 α , nota per essere un potente promotore del differenziamento dopaminergico (Fig.4 A-B).

Dopo 19 giorni di differenziamento è possibile osservare la presenza nelle colture di una popolazione di neuroni che esprimono la tirosina idrossilasi (TH), enzima chiave nella sintesi delle catecolamine e marker specifico di neuroni dopaminergici e noradrenergici. Al 40° giorno di cultura i neuroni TH positivi (TH+) mostrano una prominente arborizzazione e lunghe connessioni. Sono tuttavia necessari 80 giorni affinché la maturazione sia completa (Fig. 4 C-D). E' stato infatti osservato che, all'80°giorno di cultura molti neuroni TH+ mostrano l'espressione di marcatori di maturità, come ad esempio il trasportatore per la dopamina (DAT) (Fig. 5A).

E' stato tuttavia osservato che in queste colture i neuroni dopaminergici TH+ rappresentano circa il 30% dell'intera popolazione neuronale. Inoltre, per quanto riguarda

la popolazione di neuroni dopaminergici, non tutti mostrano la coespressione del marcatore DAT, suggerendo che all'interno della coltura possano coesistere neuroni dopaminergici a diversi livelli di maturazione. Infine circa un terzo dei neuroni TH+ sono negativi al marcatore DAT ma positivi al trasportatore della noradrenalina (NET), suggerendo la presenza di una popolazione di neuroni noradrenergici (Fig. 5B).

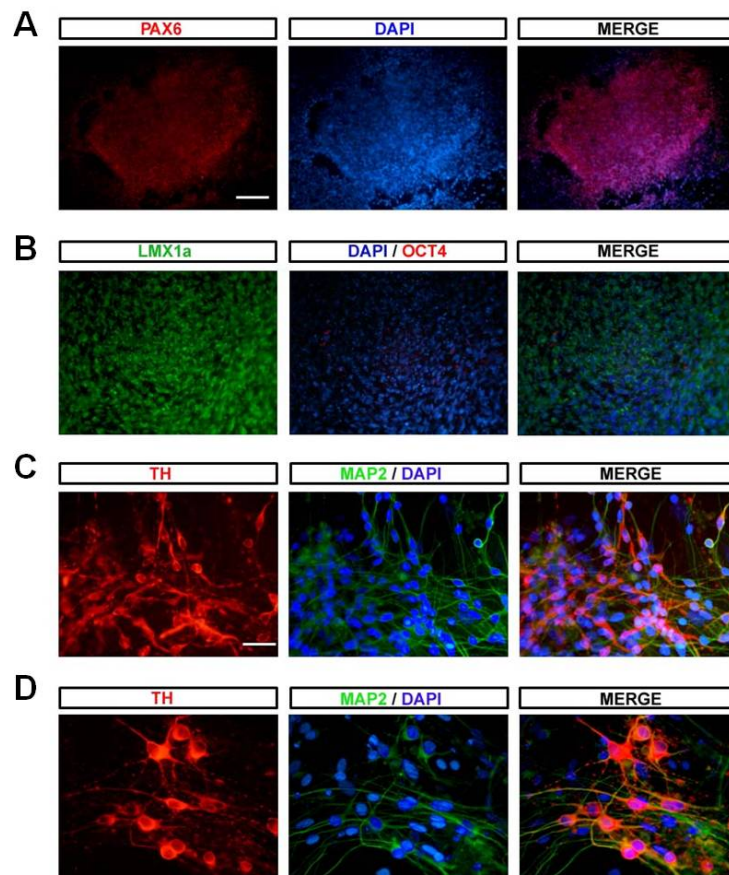


Fig. 4: Maturazione e caratterizzazione fenotipica dei neuroni dopaminergici derivati dalle cellule iPS. (A-B) L'immunofluorescenza di controllo per i marcatori PAX6 e LMX1 α all'11° giorno di cultura mostra una prominente popolazione di progenitori dopaminergici. (B-C) L'immunofluorescenza di controllo al 19° e al 40° giorno di cultura mostra l'insorgenza dei neuroni dopaminergici, positivi per il marcatore TH sulla popolazione generale di neuroni, positivi per il marcatore MAP2. I nuclei sono visualizzati mediante colorazione con DAPI. Scale Barr=50 μ m

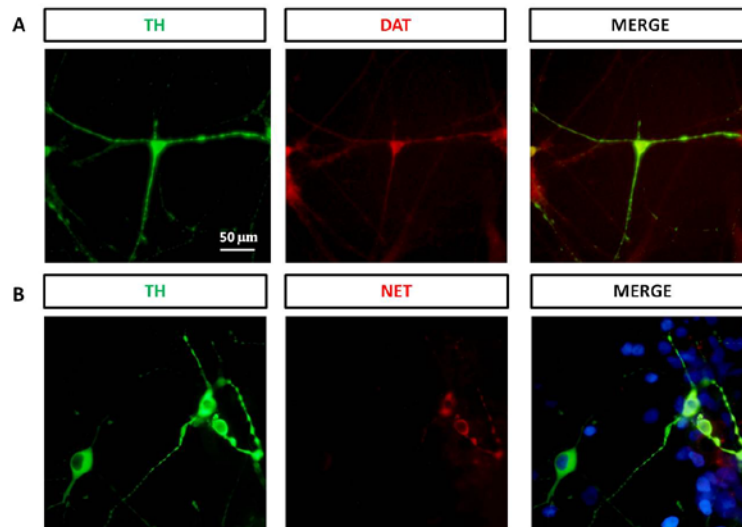


Fig. 5: I neuroni dopaminergici esprimono marcatori di maturità dopo 80 giorni di differenziamento. (A) Immagine rappresentativa di un neurone dopaminergico positivo ai marcatori TH e DAT. (B) Immagine rappresentativa di neuroni positivi ai marcatori TH e NET. I nuclei sono visualizzati mediante colorazione con DAPI. Scale Barr=50μm

Nonostante l'utilizzo di fattori di crescita e di molecole che indirizzano il differenziamento verso un fenotipo neuronale di tipo dopaminergico, la popolazione di cellule che è stata ottenuta è costituita da diversi sottotipi neuronali. Mediante immunofluorescenza è stato possibile osservare neuroni positivi al marcatore GAD67, che identifica la sottopopolazione di neuroni gabaergici (Fig. 6A) e neuroni positivi alla subunità NR2B del recettore NMDA per il glutammato (Fig. 6B). Questi risultati sono in accordo con quanto si osserva nelle culture primarie di neuroni mesencefalici murini, dove i neuroni dopaminergici rappresentano circa il 5-7% dell'intera popolazione neuronale e dove sono presenti anche sottopopolazioni di neuroni gabaergici, noradrenergici e glutammatergici.

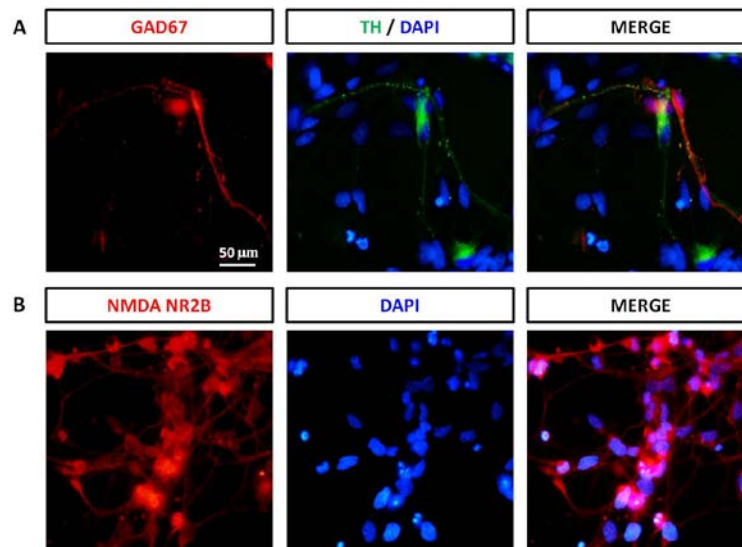


Fig. 6: Dopo il differenziamento le colture contengono cellule con diversi fenotipi neuronali. (A) Immagine rappresentativa di neuroni dopaminergici (TH+) e gabaergici (GAD67+) (B) Immagine rappresentativa di neuroni positivi alla subunità NR2B del recettore NMDA. I nuclei sono visualizzati mediante colorazione con DAPI. Scale Barr=50μm

Una più precisa caratterizzazione dei fenotipi neuronali presenti nelle colture, è stata effettuata utilizzando la tecnica RT-PCR, in grado di monitorare come viene modulata l'espressione di specifici geni durante le diverse fasi del differenziamento neuronale (Fig. 7).

In particolare è stato osservato che nelle cellule indifferenziate (iPS) nessun gene tipicamente neuronale viene espresso, ad eccezione dei geni PAX6 e NESTIN che identificano una popolazione di progenitori neuronali che talvolta può essere presente nelle colture di cellule iPS che differenziano spontaneamente.

I neuroni iniziano ad emergere dal 12° giorno di differenziamento, come evidenziato dall'espressione del gene MAP2. Attraverso l'analisi di un pannello di geni è stato possibile osservare l'espressione di geni tipici dei neuroni dopaminergici mesencefalici. In particolare il gene per la TH viene espresso a partire dal 12°giorno, così come il gene LMX1α. Altri geni vengono espressi più tardivamente, a partire dal 40°giorno, come ad esempio il gene per la dopa decarbossilasi (DDC), che codifica per un enzima coinvolto, anch'esso come la TH, nella sintesi della dopamina. NURR1, fattore di trascrizione dei neuroni dopaminergici mesencefalici, viene espresso solo nelle cellule differenziate. La sua espressione emerge, infatti, dal 19 giorno di differenziamento e permane fino a completa maturazione.

La presenza di altri fenotipi neuronali, oltre a quello dopaminergico, è stata confermata anche dall'analisi dell'espressione genica. Infatti è stata osservata l'espressione del gene

per il trasportatore vescicolare del glutammato (VGLUT2) a partire dal 19° giorno, che identifica la popolazione di neuroni glutammatergici. Anche il trasportatore vescicolare delle monoammine (VMAT2), proteina notoriamente coinvolta nel trasporto dei neurotrasmettitori, come dopamina, norepinefrina e serotonina, dal citoplasma alle vescicole sinaptiche, viene espresso a partire dal 12° giorno

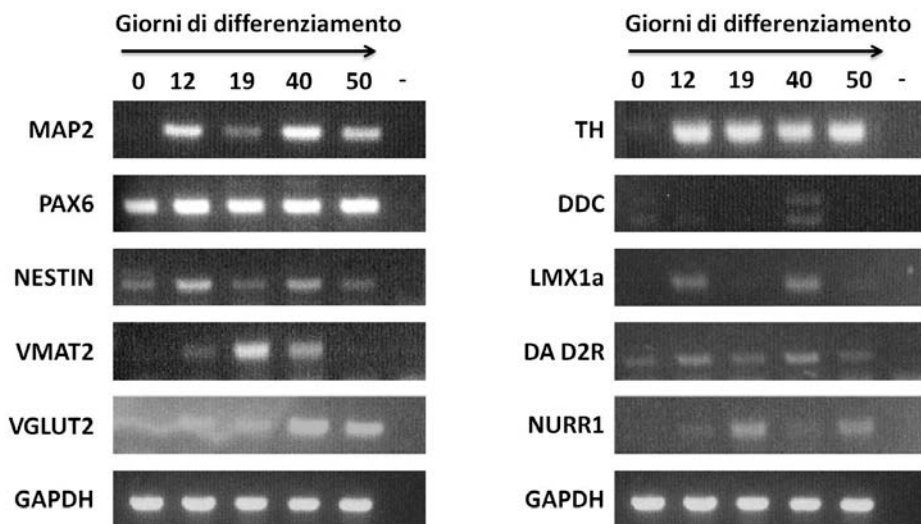


Fig. 7: Analisi RT-PCR dell'espressione genica nelle cellule iPS a diversi stadi di differenziamento. Giorno 0: cellule indifferenziate (iPS); Giorno 12: progenitori neuronali; Giorno 19-50: neuroni a diversi stadi di maturazione; - : controllo negativo (no DNA).

3. Caratterizzazione biochimico/funzionale dei neuroni dopaminergici

I neuroni dopaminergici mesencefalici esprimono alcuni sottotipi di recettori per la dopamina, quali il recettore D2 e il recettore D3. E' noto che la stimolazione dei recettori per la dopamina D2/D3 attiva una cascata del segnale che porta ad un aumento significativo della fosforilazione della MAP chinasi ERK (Collo et al. 2008). E' inoltre stato dimostrato che anche la stimolazione di altri recettori presenti sui neuroni dopaminergici, come ad esempio il recettore nicotinic $\alpha 4\beta 2^*$, attiva ERK. Per determinare la funzionalità dei neuroni dopaminergici ottenuti mediante il differenziamento delle cellule iPS, le culture sono state trattate con agonisti preferenziali dei recettori D2/D3 per la dopamina, come quinpirolo o 7OHDPAT, con l'agonista del recettore D1 per la dopamina SKF81297 o con nicotina.

Brevemente, a 50 giorni di differenziamento, le cellule sono state mantenute in un terreno privo di fattori di crescita per circa due giorni. Successivamente sono state trattate per 2

minuti con quinpirolo (10 μ M), dopamina (10 μ M), 7OHDPAT (50 nM), SKF81297 (1 μ M) o nicotina (10 μ M). Alla fine del trattamento, le cellule sono state lisate e sono stati ottenuti estratti proteici, successivamente analizzati con la tecnica del western blot. L'analisi delle proteine estratte dopo il trattamento ha mostrato un aumento significativo della fosforilazione di ERK in seguito a trattamento con gli agonisti dopaminergici quinpirolo, dopamina e 7OHDPAT suggerendo che tali cellule esprimono un corredo completo di recettori D2/D3 per la dopamina e che tali recettori sono funzionali. Diversamente, la stimolazione con l'agonista del recettore D1 per la dopamina SKF81297 non ha prodotto alcun aumento della fosforilazione di ERK, risultato atteso in quanto i neuroni dopaminergici mesencefalici non esprimono recettori D1. Infine anche la nicotina ha prodotto un aumento significativo della fosforilazione di ERK suggerendo che anche i recettori per la nicotina sono espressi e sono in grado di produrre un segnale all'interno della cellula (Fig. 8).

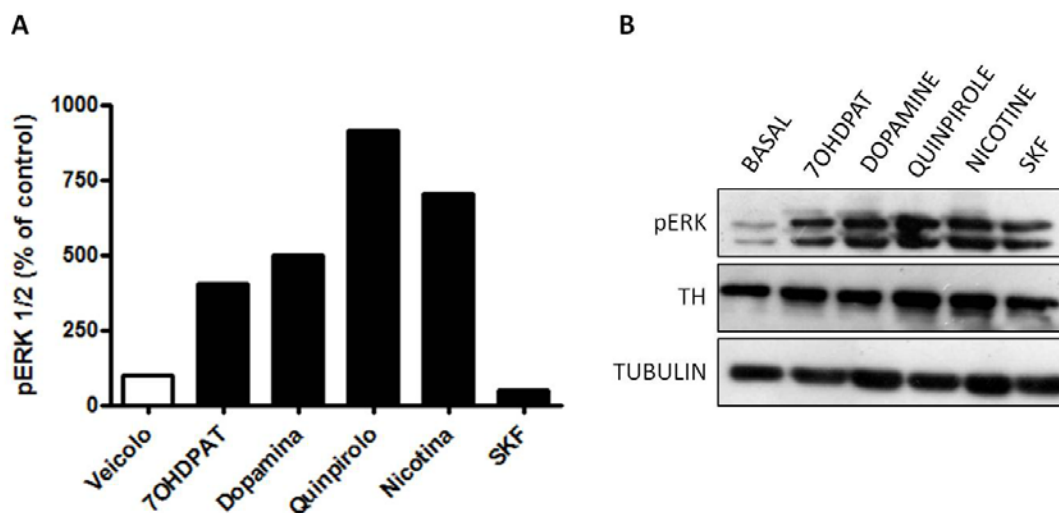


Fig.8: Attivazione della fosforilazione di ERK in neuroni dopaminergici differenziati da cellule iPS. (A) Nel grafico è rappresentata la quantificazione densitometrica dell'attivazione della fosforilazione di ERK in seguito a stimolo con 7OHDPAT (50 nM), dopamina (10 μ M), quinpirolo (10 μ M), nicotina (10 μ M) e SKF81297 (1 μ M). I valori sono stati normalizzati rispetto ai livelli di TH e tubulina. (B) Immagine rappresentativa dell'analisi western blot per ERK fosforilato (pERK), TH e tubulina.

Per escludere il coinvolgimento degli astrociti presenti nelle culture di neuroni dopaminergici nella mediazione degli effetti prodotti dagli agonisti dopaminergici sulla fosforilazione di ERK, sono stati eseguiti gli stessi trattamenti su culture parallele di astrociti primari murini.

I dati in Fig. 9 mostrano che il trattamento di 2 minuti con agonisti dopaminergici e nicotina su culture di astrociti primari murini non produce alcun aumento significativo della fosforilazione di ERK, suggerendo che non vi è alcun contributo da parte degli astrociti nei risultati ottenuti sulle culture di neuroni dopaminergici.

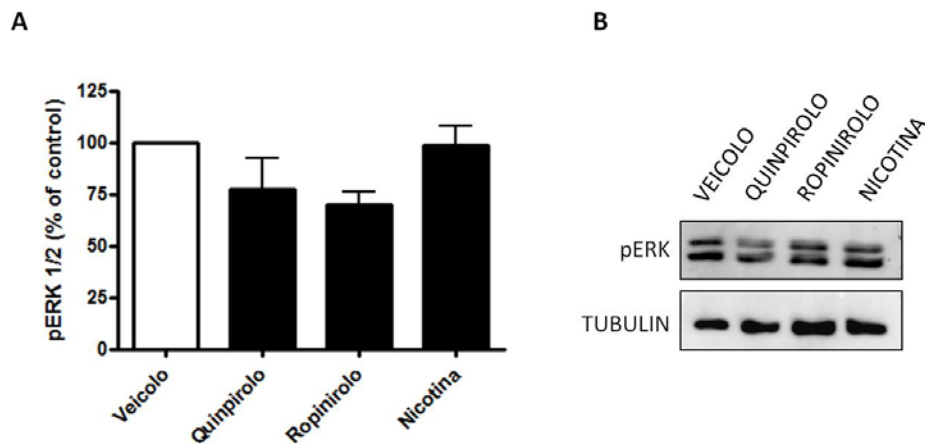


Fig. 9: Fosforilazione di ERK in culture di astrociti primari murini. (A) Nel grafico è rappresentata la quantificazione densitometrica dell'attivazione della fosforilazione di ERK in seguito a stimolo con quinpirolo (10 μ M), ropinirolo (10 μ M) e nicotina (10 μ M). I valori sono stati normalizzati rispetto ai livelli di tubulina. (B) Immagine rappresentativa dell'analisi western blot per pERK e tubulina.

CONCLUSIONI

In conclusione, il nostro laboratorio è stato in grado di generare cellule iPS da fibroblasti di individui sani. Queste cellule possiedono tutte le caratteristiche tipiche delle cellule staminali, sia dal punto di vista morfologico, che per l'espressione di specifici marcatori e per la pluripotenza. Utilizzando un particolare protocollo abbiamo differenziato le iPS in fenotipi neuronali. In questa popolazione di neuroni maturi sono presenti differenti fenotipi neuronali tra cui abbiamo caratterizzato neuroni dopaminergici maturi, che possiedono il tipico corredo recettoriale e sono in grado di rispondere a farmaci, neuroni noradrenergici, neuroni glutammatergici e neuroni GABAergici. Il fatto di ottenere popolazioni neuronali diverse rappresenta un grosso vantaggio per lo studio dei meccanismi molecolari delle malattie umane e per valutare la risposta ai farmaci. Il neurone dopaminergico è infatti un modello per studiare la malattia di Parkinson, i neuroni dopaminergici e noradrenergici rappresentano uno strumento importante per studiare la depressione e i neuroni glutammatergici per studiare la schizofrenia e altre malattie psichiatriche.

Attualmente sono in corso nel nostro laboratorio esperimenti funzionali sui neuroni dopaminergici differenziati dalle cellule iPS, al fine di verificare la funzionalità dei processi di sintesi e rilascio del neurotrasmettitore dopamina. Tali esperimenti verranno eseguiti in collaborazione con la Dott.ssa Laura Dalla Corte dell'Università di Firenze.

Infine, è in corso la riprogrammazione a iPS e successivamente differenziazione in neuroni di fibroblasti provenienti da pazienti con depressione maggiore al fine di studiare le caratteristiche fisio-patologiche della malattia e la sensibilità ai farmaci.