

**Short Term Mobility Program – CNR 2013**  
**Relazione Scientifica**  
**Dr. Antonella Farsetti**

**Titolo del progetto: “Role of thyroid hormones and epigenetic drugs in cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells”.**

Durante il soggiorno presso la Goethe University di Francoforte, Department of Cardiology (2-23 Settembre 2013) ho ottenuto risultati molto promettenti, sintetizzati nei seguenti paragrafi:

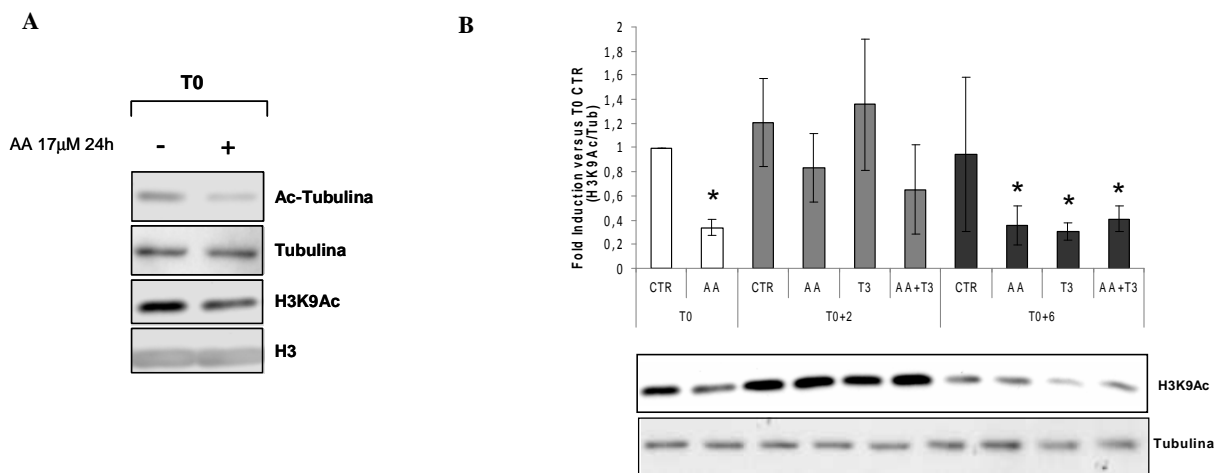
**1. Caratterizzazione del modello sperimentale: valutazione dei livelli di acetilazione istonica in condizioni basali e dopo trattamento con acido anacardico (AA) e triiodotironina (T<sub>3</sub>)**

Gli inibitori delle acetilasi istoniche esercitano la loro attività interferendo con l’attività delle HAT impedendo in tal modo che la reazione di acetilazione dei substrati abbia luogo. L’acido anacardico è un derivato naturale in grado di inibire l’acetilazione di particolari substrati istonici, agendo principalmente su p300, PCAF e Tip60.

Per verificarne gli effetti sul nostro sistema cellulare, sono stati condotti saggi di Western Blot utilizzando anticorpi che riconoscono l’acetilazione della lisina 9 dell’istone H3 (H3K9Ac) e della Tubulina (Ac-Tub).

La linea cellulare utilizzata è il clone fluorescente delle cellule staminali embrionali murine R1, le **SyNRFP7**, in condizioni basali e dopo trattamento specifico con: *i.* acido anacardico (AA) 24 ore prima dell’inizio del differenziamento cardiomiocitario (*priming* al tempo T<sub>0</sub>-1); e *ii.* la sola T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>) o l’associazione di AA e T<sub>3</sub> (AA+T<sub>3</sub>) a partire dal tempo T<sub>0</sub>, con un rinnovamento della T<sub>3</sub> ad ogni manipolazione della linea cellulare e/o cambio di terreno, come previsto dal protocollo sperimentale.

Il solo trattamento di 24 ore con AA è in grado di ridurre lo stato di acetilazione di proteine non istoniche, la tubulina, ed istoniche, quali l’istone H3, come riportato in **Fig.1A**.



**Fig. 1: A.** Effetto del trattamento con AA al tempo T<sub>0</sub> sullo stato di acetilazione di proteine non istoniche ed istoniche. **B.** Analisi densitometrica (n=5) e un Western Blot dimostrativo dello stato di acetilazione di proteine istoniche in condizioni basali e dopo trattamento con AA e/o T<sub>3</sub> nel corso del differenziamento cardiaco. \*p< 0.05 vs T<sub>0</sub> CTR

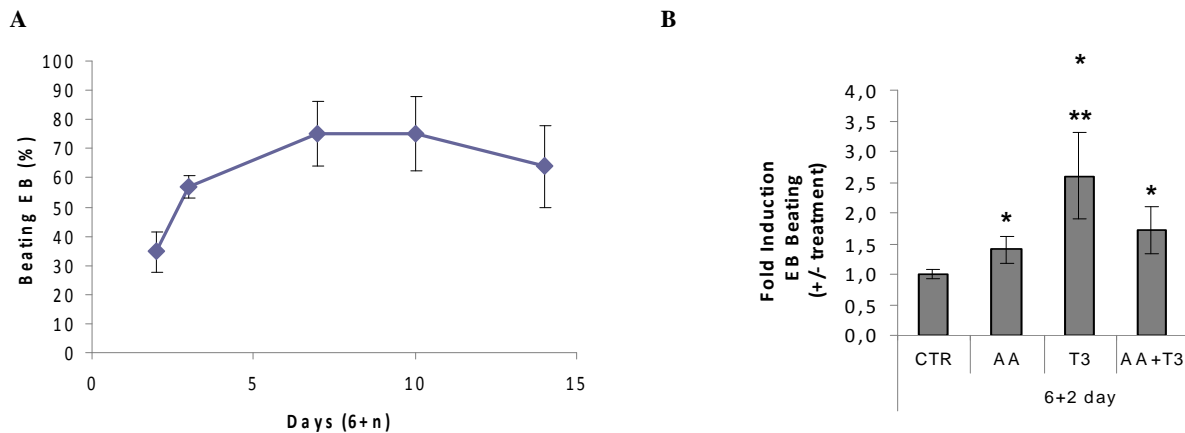
La **Figura 1B**, che rappresenta l'analisi densitometrica delle bande visualizzate sul filtro (derivate da 5 esperimenti indipendenti), mostra una consistente riduzione dei livelli di acetilazione dell'istone H3 in lisina 9 dopo 24 ore di trattamento con acido anacardico (T0), livelli che risalgono in maniera consistente dopo 2 giorni (T0+2) dal trattamento e riscendono al tempo T0+6, come un'onda di acetilazione che permette la chiusura e poi l'apertura della cromatina per indurre una trascrizione genica specifica del differenziamento.

Un'informazione rilevante già in nostro possesso era rappresentata dal fatto che il nostro sistema cellulare esprime principalmente il recettore tiroideo di tipo alfa, TR $\alpha$ , mentre il recettore tiroideo di tipo beta, TR $\beta$  è meno rappresentato.

## 2. Effetto dei trattamenti epigenetici ed ormonali sul differenziamento cardiomiocitario

Al termine del differenziamento, il protocollo *Hanging Drop* prevede che i corpi embrioidi che si sono formati, vengano piastrati in *multiwell* da 24 pozzetti. A partire da questo stadio la crescita ed il battito di ciascun EB è stato controllato ai giorni 6+2, 6+3, 6+7, 6+10 e 6+14 dove 2, 3, 7, 10 e 14 rappresentano il numero di giorni trascorsi dal piastramento su gelatina dei singoli EB. Il grafico in **Figura 2A** mostra la percentuale dei corpi battenti che si differenziano in condizioni basali.

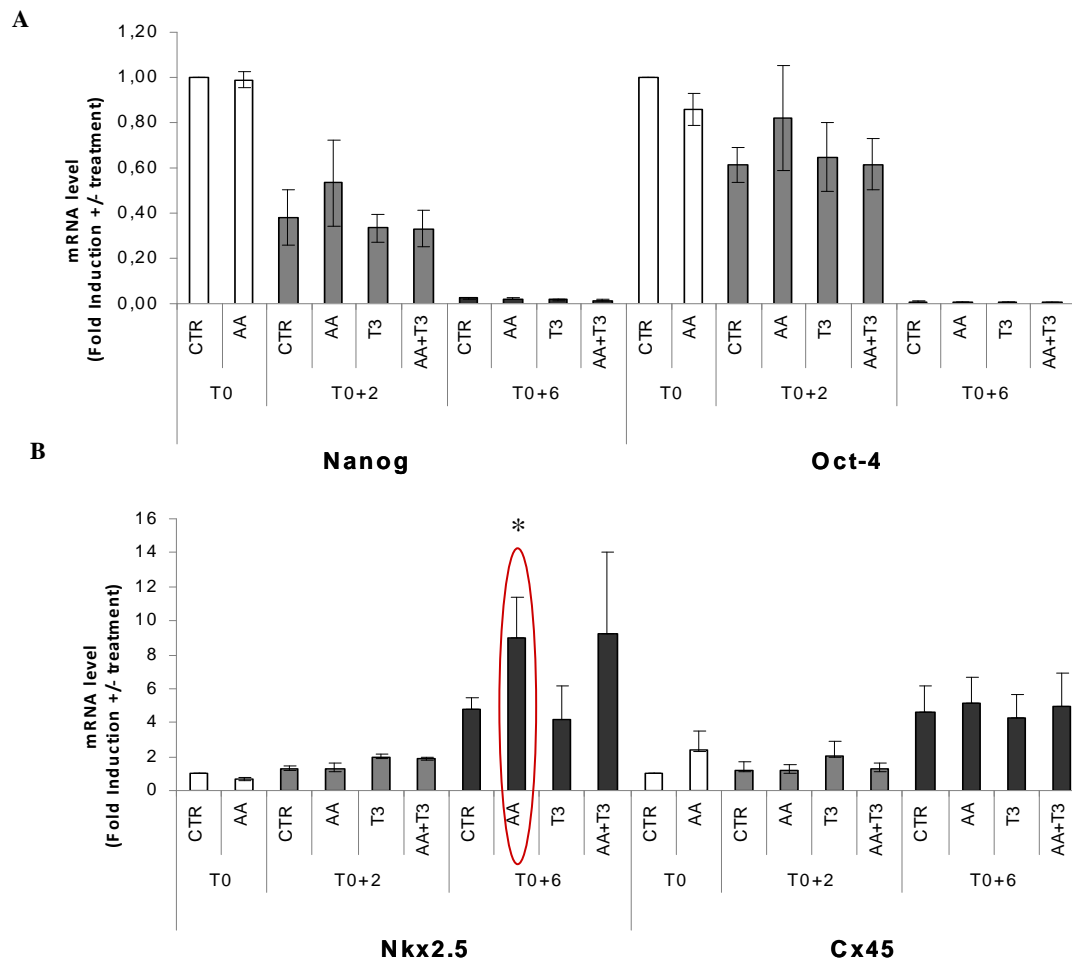
Come è possibile osservare in **Fig.2B**, sia il trattamento con acido anacardico (AA) sia il trattamento con la T<sub>3</sub>, singolarmente (T<sub>3</sub>) e in combinazione con l'AA (AA+T<sub>3</sub>), incrementano il numero dei corpi embrioidi battenti e la velocità di differenziamento, determinando un'anticipazione del tempo di contrazione al giorno 6+2, solitamente stimato e riportato in letteratura al tempo 6+3.



**Fig.2: A.** Percentuale di battito nel differenziamento cardiaco in condizioni basali. **B.** Effetti del trattamento con AA e/o T<sub>3</sub> sul differenziamento cardiomiocitario espressa in percentuale di battito al tempo 6+2. \* $p < 0.05$  vs T0 CTR; \*\* $p < 0.05$  vs AA

Al fine di controllare l'espressione coordinata dei geni che intervengono nel differenziamento cardiaco è stata condotta un'analisi dell'espressione di marcatori tipici della staminalità, quali Oct4 e Nanog, e del differenziamento, quali Nkx2.5 e la connessina Cx45, sia in condizioni basali sia dopo trattamento con acido anacardico e triiodotironina, singolarmente o in combinazione. I risultati, rappresentati nella **Figura 2A-B**, mostrano come sia la T<sub>3</sub> che l'AA non siano in grado di modulare significativamente i geni della staminalità, ma soltanto il *priming* con AA è in grado di aumentare l'espressione di Nkx2.5 al tempo T0+6 del differenziamento rispetto al controllo. Questo gene, è fortemente coinvolto negli stadi precoci del differenziamento cardiomiocitario.

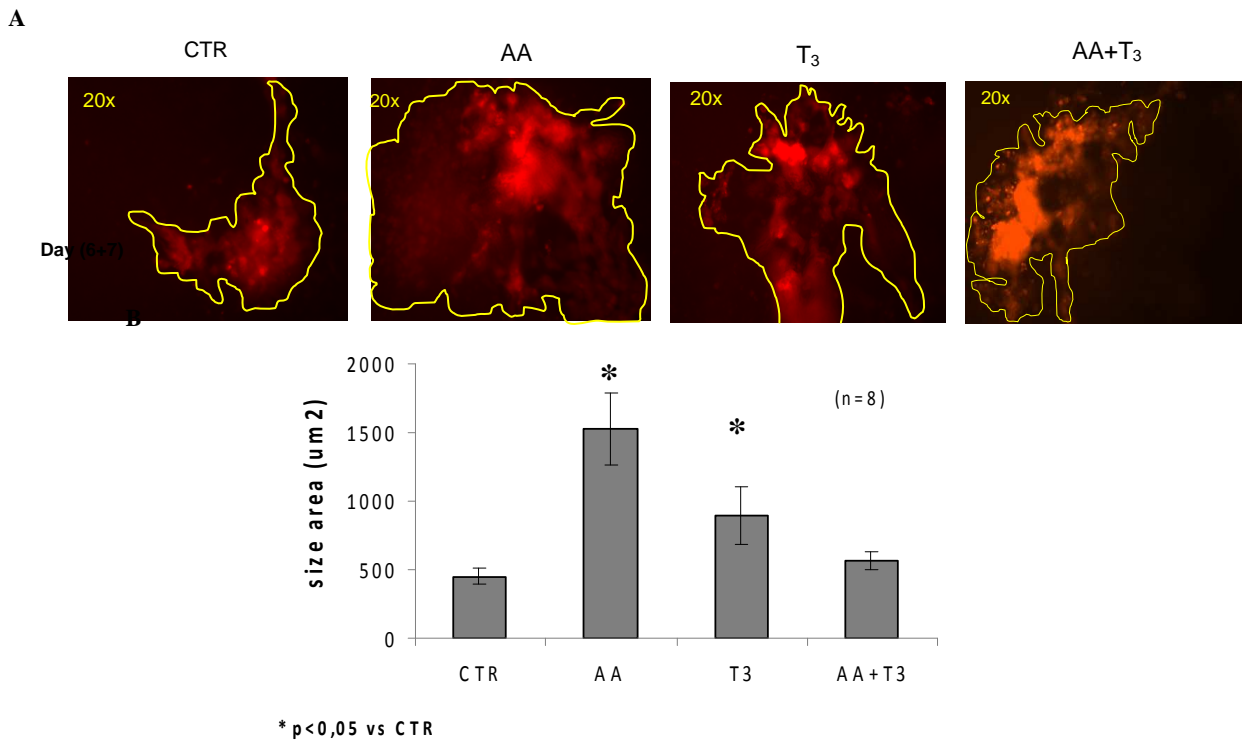
L'espressione della connessina Cx45, una *gap junction* espressa precocemente nel tessuto cardiaco in via di formazione, non viene invece modulata dal trattamento con acido anacardico, ma mostra un profilo dinamico che segue i diversi stadi differenziativi.



**Fig. 3:** Analisi di qRT-PCR per i geni ( $n=6$ ): **A.** *Oct4* e *Nanog*; **B.** *Nkx 2.5* e *Cx4 5* prima e dopo trattamento con AA e  $T_3$ ; il gene di controllo utilizzato per la normalizzazione è *GAPDH*. \* $p < 0.05$  vs CTR.

Il nostro sistema cellulare si avvale di cellule staminali murine ingegnerizzate con sito **RFP** (*Red Fluorescent Protein*) sotto il controllo del promotore di un gene del differenziamento cardiaco denominato *NCX1*: le cellule diventano fluorescenti solo quando effettivamente acquisiscono il fenotipo cardiaco. In virtù di questo sistema ingegnerizzato è stato possibile distinguere le aree del corpo embrioidale dalle cellule della muscolatura liscia, per poterle analizzare e studiare con maggior accuratezza.

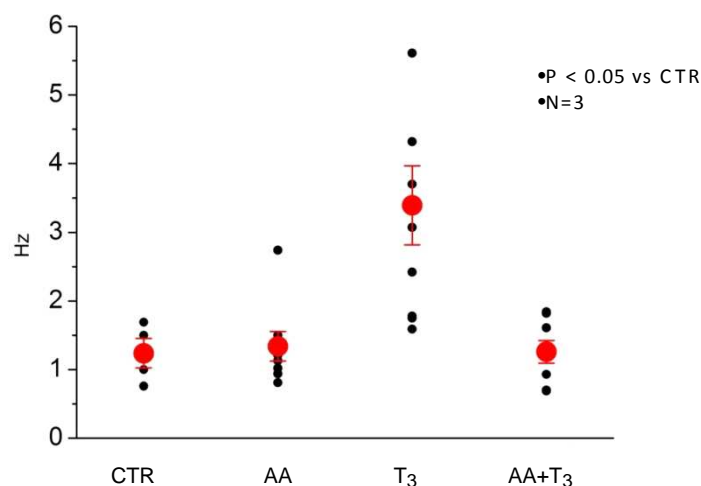
Osservando al microscopio a fluorescenza i corpi embrioidi, è emerso un dato molto interessante: le dimensioni dell'area battente dei campioni trattati con acido anacardico risultavano essere più grandi sia rispetto al controllo sia rispetto ai campioni trattati con  $T_3$ . Il trattamento con triiodotironina è in grado di indurre lo stesso fenomeno anche se in maniera meno significativa rispetto all'acido anacardico; come è possibile apprezzare sia dalle immagini mostrate in **Figura 4A** sia dal grafico in **Figura 4B** che riporta in micrometri le dimensioni dell'area battente, fotografata al microscopio a fluorescenza.



**Fig. 4:** **A.** Aree battenti visualizzate al microscopio a fluorescenza. E' mostrato un esperimento rappresentativo di un totale di 8 esperimenti indipendenti **B.** Dimensioni area battente espressa in  $\mu\text{m}^2$ .

Il fenomeno osservato poteva però essere attribuito a due cause: *i.* all'incremento del numero di cardiomiociti all'interno del corpo embrioido o *ii.* all'aumento delle dimensioni delle singole cellule. Per rispondere a questa domanda abbiamo utilizzato l'analisi citofluorimetrica (FACS), condotta su corpi embrioidi al 7° giorno dalla piastratura. I risultati ottenuti hanno confermato le osservazioni effettuate al microscopio a fluorescenza, mostrando che le cellule trattate sia con acido anacardico che con la T<sub>3</sub>, singolarmente o in combinazione, sono più fluorescenti e numericamente superiori rispetto al controllo, sebbene la T<sub>3</sub> abbia un effetto meno marcato (*dato non mostrato*).

Per caratterizzare in modo più esaustivo il fenotipo cellulare abbiamo successivamente analizzato le proprietà elettriche di cellule autoritmiche isolate dalle porzioni contrattili dei corpi embrioidi al giorno 6+7. Il criterio da noi adottato per selezionare le cellule da studiare dal punto di vista elettrofisiologico si basa sulla loro capacità di contrarsi spontaneamente e sul fatto che caratteristica peculiare del nostro modello sperimentale è l'emissione di fluorescenza nello spettro del rosso di cellule differenziate verso un fenotipo cardiaco durante l'analisi al microscopio video-confocale. Abbiamo condotto esperimenti di *patch-clamp* in modalità "*current clamp*" per valutare la frequenza di auto-depolarizzazione o "*firing*" delle cellule autoritmiche non trattate (CTR) e delle cellule autoritmiche sottoposte a trattamento con T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>), AA (AA) oppure con il doppio trattamento (AA+T<sub>3</sub>). L'analisi della frequenza ha mostrato che il trattamento con T<sub>3</sub> genera cellule con una frequenza spontanea media significativamente maggiore ( $3.39 \pm 0.57$  Hz,  $n=9$ ;  $p < 0.05$  con analisi statistica di tipo Anova ad una via) di quella ottenuta dalle cellule sottoposte a tutti gli altri trattamenti (AA  $1.34 \pm 0.61$   $n=8$ , AA+T<sub>3</sub>  $1.26 \pm 0.16$   $n=8$ ) o dalle cellule non trattate del controllo (CTR  $1.24 \pm 0.21$  Hz,  $n=4$ ) (**Fig. 5**).



**Fig. 5.** Analisi della frequenza in condizioni basali e dopo trattamento con l'AA e la T<sub>3</sub>, singolarmente o in combinazione.

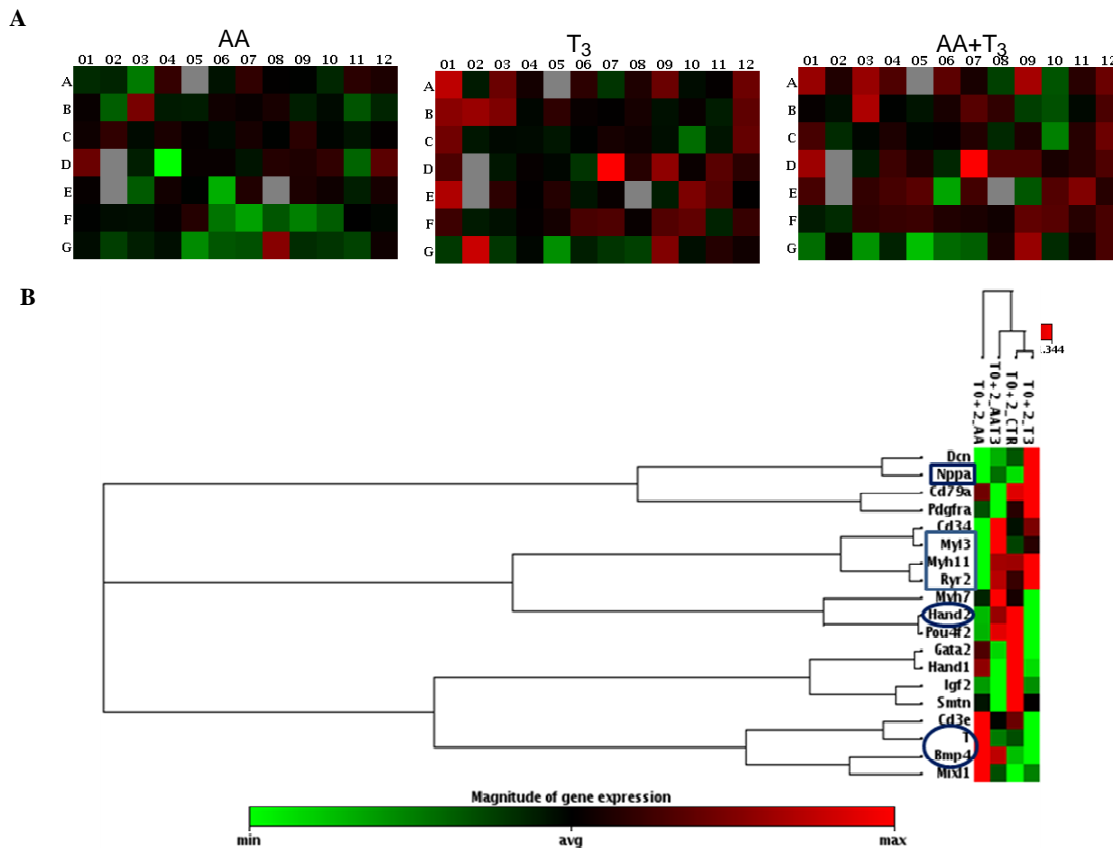
E' noto che la particolarità che contraddistingue il potenziale d'azione delle cellule autoritmiche da quello delle altre cellule cardiache è l'assenza di una fase di riposo stabile tra un potenziale d'azione e l'altro. Infatti, i miociti con attività autoritmica presentano una fase di depolarizzazione diastolica lenta (o *pacemaker*), che conduce il potenziale di membrana verso il valore soglia per l'insorgenza di un nuovo potenziale d'azione. L'assenza di una fase di riposo stabile induce così un'attività ripetitiva e autoritmica. Complessivamente i dati ottenuti mediante analisi molecolare, citofluorimetrica ed elettrofisiologica hanno messo in evidenza la presenza di molteplici vie di segnalazione (*pathways*) sotto il controllo dall'AA e dalla T<sub>3</sub>, somministrati singolarmente o in combinazione, che favoriscono il differenziamento cardiaco.

### 3. Analisi del profilo trascrizionale nel corso del differenziamento cardiaco: effetti del trattamento epigenetico e/o ormonale.

Per comprendere i meccanismi che intervengono nel differenziamento cellulare e nei processi che lo rendono reversibile sono state effettuate analisi di espressione genica (*gene profiling*) mediante tecnologia dei microarray su RNA estratto dalle cellule ES durante il differenziamento, ed in particolare ai tempi T<sub>0</sub>, T<sub>0</sub>+2 e T<sub>0</sub>+6, in condizioni basali e dopo trattamento singolo o combinato con AA e T<sub>3</sub>.

Dati preliminari di *gene profiling* mostrano come l'AA e/o la T<sub>3</sub> giochino un ruolo determinante nell'attivazione o la repressione controllata, a tempi ben definiti, di *network* di geni coinvolti in *pathways* diversi. In particolare l'AA induce l'espressione dei soli geni coinvolti nel differenziamento cardiomiocitario precoce, quali Hand2, Bmp4 e Brachyury, generando cellule cardiache immature, ed indirizza, inoltre, il differenziamento verso un *lineage* neuroectodermico (dati non mostrati).

Il trattamento con la T<sub>3</sub> è, invece, in grado di aumentare l'espressione di geni chiave del differenziamento cardiaco terminale, quali Nppa, Ryr2, Myl3 e Myh11, determinando così la formazione di cardiomiociti maturi e funzionanti (**Fig. 6, AB**).



**Fig. 6: A.** Rappresentazione grafica, mediante Heat Map, dell'analisi di gene profiling. **B.** Rappresentazione grafica, mediante Cluster, di una selezione di geni coinvolti nel differenziamento mesodermico e cardiaco terminale (sono indicati con i quadrati i geni del differenziamento terminale, con cerchi i geni del differenziamento precoce). E' mostrato un esperimento rappresentativo di un totale di 8 esperimenti indipendenti (AA e/o T<sub>3</sub> verso il controllo al tempo T0+2).

Di notevole interesse è stato osservare che il trattamento combinato (AA+T<sub>3</sub>) sembra riprodurre sostanzialmente il profilo genico del differenziamento cardiaco di tipo terminale indotto dal trattamento con la singola T<sub>3</sub>.

Analisi più approfondite di *RNA sequencing* avviate durante il soggiorno presso la Goethe University ed attualmente in corso, ci permetteranno di identificare e validare geni *targets* del differenziamento cardiaco sotto il controllo delle diverse *pathways* indotte dal trattamento ormonale e/o epigenetico, al fine di fornire in futuro una valida alternativa per potenziare la produzione di cellule cardiache mature e funzionali per l'intervento terapeutico di tipo rigenerativo.

Roma, 11 Novembre 2013

Dr. Antonella Farsetti