

## **Relazione finale Short Term Mobility**

Il programma STM, coordinato dalla Dott.ssa Elena Levantini e svolto nel laboratorio del Prof. Daniel G. Tenen, presso il Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC), ospedale affiliato alla Harvard Medical School, nel periodo 1 Novembre 2016-22 Novembre 2016 aveva come obiettivo l'identificazione delle sottopopolazioni stromali del midollo osseo attraverso l'innovativa tecnica del *single cell sequencing*.

Le Cellule Stromali Midollari (MSCs) sono cellule adulte multipotenti in grado di differenziare in diversi tipi cellulari del tessuto mesenchimale, tra cui adipociti, osteociti e condrociti. Virtualmente presenti in tutti i tessuti adulti, sono state isolate originariamente dal midollo osseo. In questa sede, le MSCs, insieme agli adipociti e agli osteoblasti che da esse derivano, costituiscono elementi essenziali della nicchia ematopoietica, contribuendo alla regolazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs). Per la loro facile accessibilità, la multipotenza, le proprietà immunomodulatorie e la capacità di creare un microambiente rigenerativo in seguito a danno tissutale, le MSCs sono oggetto di studio per le enormi potenzialità applicative nel campo della medicina rigenerativa. Tuttavia, per il loro utilizzo ottimale è necessario conoscere i meccanismi molecolari che ne regolano la proliferazione e la differenziazione, in particolare nella fase precoce del *commitment* verso uno specifico *lineage*, tuttora poco definita.

Pur essendo di grande interesse, il loro studio in modelli murini è ostacolato dalla mancanza di marcatori specifici per cellule staminali e precursori di diversi *lineages* e stadi differenziativi.

Attraverso l'innovativa tecnica del *single cell sequencing* è possibile sequenziare i trascrittomi delle singole cellule che compongono una popolazione eterogenea. L'applicazione di questa tecnica alle MSCs ha avuto come scopo la caratterizzazione dell'organizzazione gerarchica delle cellule stromali e l'identificazione di nuovi specifici marcatori di superficie, da validare tramite citofluorimetria (FACS).

### **Materiali e metodi**

#### **Colture di Cellule Stromali Midollari (MSCs)**

Per allestire le colture di MSCs da topi wild type è stato isolato il midollo osseo di tibie e femori. Il midollo osseo è stato isolato dalla cavità midollare facendo passare all'interno di essa del mezzo di coltura, mediante una siringa (0,4x12mm) ed è stato recuperato in 2mL di  $\alpha$ -MEM (Gibco), 10% FBS (Gibco), 1% Pen-Strep (Life Technologies).

Le ossa sono state tagliate in frammenti di circa 3-5 mm e digerite con Collagenasi/Dispasi ( $\alpha$ -MEM, 10% FBS, 1mg/ml Collagenasi/Dispasi (Roche)) a 37°C per 30 minuti in agitazione a 200rpm. La reazione è stata bloccata aggiungendo 10 ml di PBS1x. Dopo la digestione enzimatica sono state raccolte le cellule rilasciate dai frammenti ossei attraverso centrifugazione a 1200 rpm.

Le cellule ottenute sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata con 5% di CO<sub>2</sub>. Il mezzo di coltura è stato cambiato per metà ogni 3 giorni. Le cellule sono state staccate dalle piastre (1 minuto in presenza di Tripsina 0.25mg/ml (Life Technologies)) una volta raggiunta la confluenza e seminate ad una densità di 20.000cellule/cm<sup>2</sup>.

#### **Analisi citofluorimetrica (FACS) e *Sorting***

Le cellule trispinizzate sono state lavate in PBS 1x, centrifugate e risospese in una soluzione di staining composta da PBS1x, FBS 10% e gli anticorpi specifici coniugati con il fluoroforo APC (anti-CD34, anti-CD45 e anti-Ter119 (BioLegend), 0,2mg/ml, diluizione 1:100). In seguito all'incubazione di 30 minuti a 4°C al buio, sono seguiti due lavaggi in PBS1x per eliminare gli anticorpi in eccesso. Una volta rispesi in PBS1x i campioni sono stati sottoposti a una separazione cellulare (BD FACSAria). Le cellule morte sono state escluse attraverso l'utilizzo del marker nucleare DAPI (DAPI+).

### Single Cell Sequencing

Le cellule sortate sono state contate in una camera di Burker con il colorante vitale Trypan Blue (Biowest), che viene escluso dalle cellule vive e al contrario colora di blu le cellule morte. L'inDrop (Figura 1), la più recente tecnologia di *single cell sequencing*, è stato eseguito presso la facility del Dr. Klein alla Harvard Medical School, seguendo il protocollo sviluppato dal gruppo del Dr. Klein (Klein et al., Cell 2015).

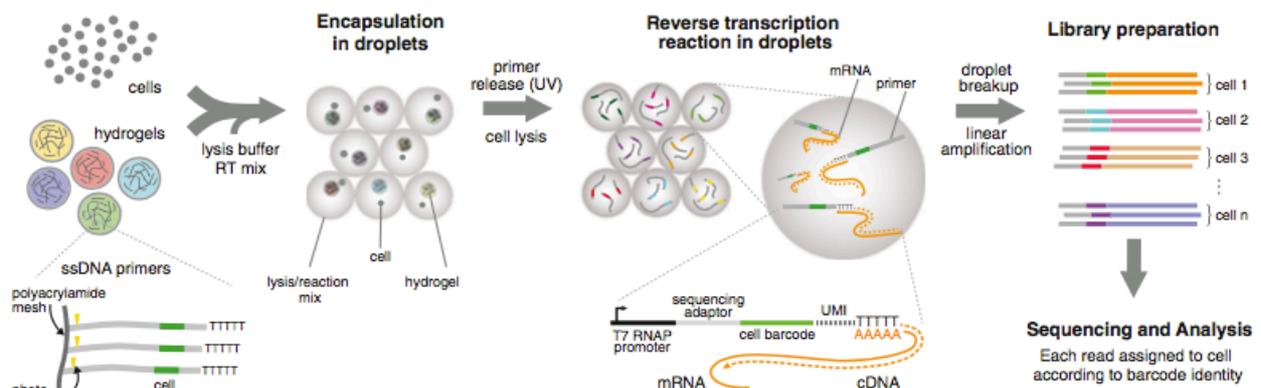


Fig.1: Rappresentazione schematica del protocollo del *single cell sequencing* tramite la tecnologia inDrop (Klein et al., Cell 2015)

## Risultati

Al fine di analizzare *in vitro* tutte le componenti cellulari stromali che *in vivo* costituiscono la nicchia delle HSCs sono state isolate e messe in coltura sia le cellule del midollo osseo sia le cellule rilasciate dal tessuto osseo attraverso la digestione enzimatica con Collagenasi/Dispasi. In parallelo sono stati messi in coltura anche i frammenti ossei sottoposti alla digestione, per permettere alle cellule contenute negli stessi di crescere ed espandersi. Tutte le componenti cellulari in adesione in piastra una volta raggiunta la confluenza a p0 sono state trispinizzate e seminate insieme. Le colture di MSCs sono state mantenute in condizioni di espansione per i successivi 2 passaggi per arricchire la componente stromale a sfavore di cellule endoteliali e ematopoietiche contaminanti (Fig.2).

Le MSC mantenute in uno stato indifferenziato (p2 e p3) sono state utilizzate per il *single cell sequencing*.

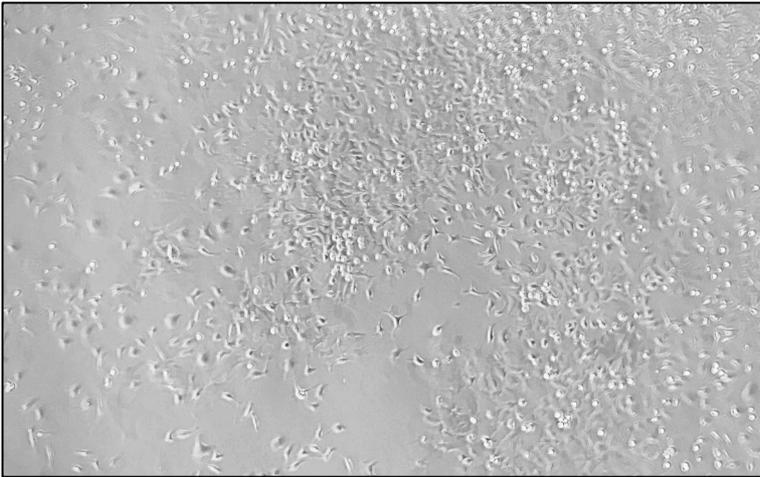
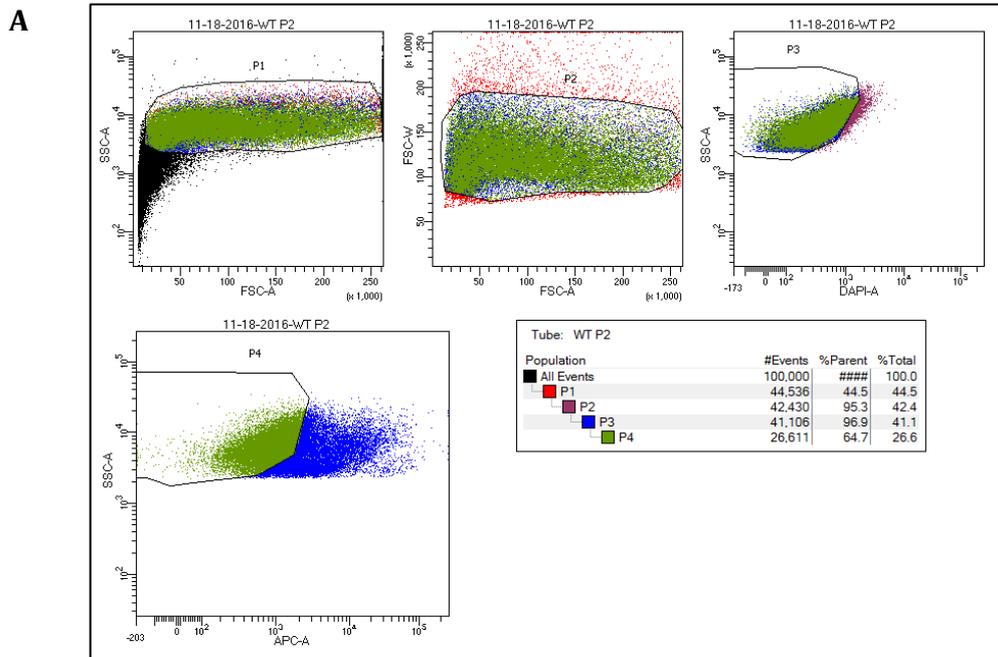


Fig. 2: Coltura di MSCs

Per eliminare dalle colture eventuali contaminazioni di cellule endoteliali (CD34<sup>+</sup>) e ematopoietiche (CD45<sup>+</sup> Ter119<sup>+</sup>) è stato eseguito un sorting per isolare solo la componente negativa (Fig. 3). Le cellule CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup> così isolate sono state utilizzate per l'inDrop.



B

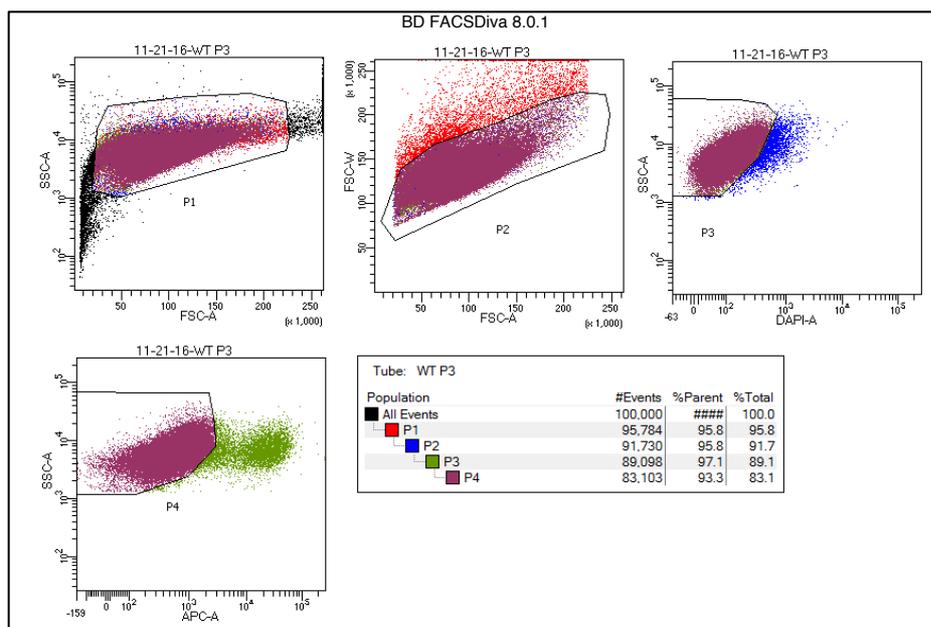


Fig.3: A: Analisi citfluorimetrica delle cellule a p2. B: Analisi citfluorimetrica delle cellule a p3

Le cellule sono state contate e colorate con il colorante Trypan Blue che ha mostrato una percentuale di cellule vitali molto alta, pari al 90%.

Data l'ottima qualità del campione abbiamo potuto procedere con l'inDrop.

Per l'inDrop sono state utilizzate 6000 cellule per ogni campione (p2 e p3). Ogni cellula è stata incapsulata con successo in una goccia dove è avvenuta la retrotrascrizione dell'RNA mediante primers indicizzati (Fig. 4). Questo ha consentito di marcare con un indice specifico il cDNA corrispondente ad ogni cellula (Klein et al., Cell 2015).

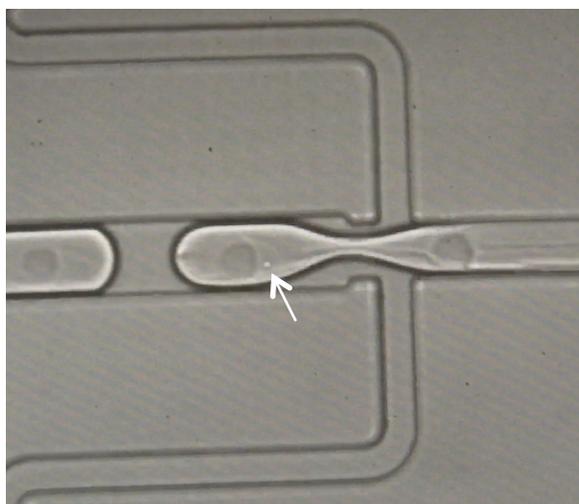


Fig. 4: Formazione della goccia che contiene la singola cellula (freccia bianca) e i reagenti necessari per la reazione.

I cDNA così ottenuti sono stati utilizzati per preparare le libraries che sono state sequenziate su piattaforma Illumina (HiSeq) ottenendo quindi i trascrittomi delle singole cellule.

Dal punto di vista tecnico l'esperimento è pienamente riuscito rispettando in ogni suo passaggio tutti i parametri di qualità richiesti.

L'analisi bioinformatica dei data sets generati è tuttora in corso. Il clustering bioinformatico dei trascrittomi permetterà di caratterizzare l'organizzazione gerarchica

delle cellule stromali. Inoltre il confronto fra i profili di espressione delle sottopopolazioni cellulari, permetterà di identificare nuovi specifici marcatori di superficie, da validare tramite citofluorimetria (FACS).

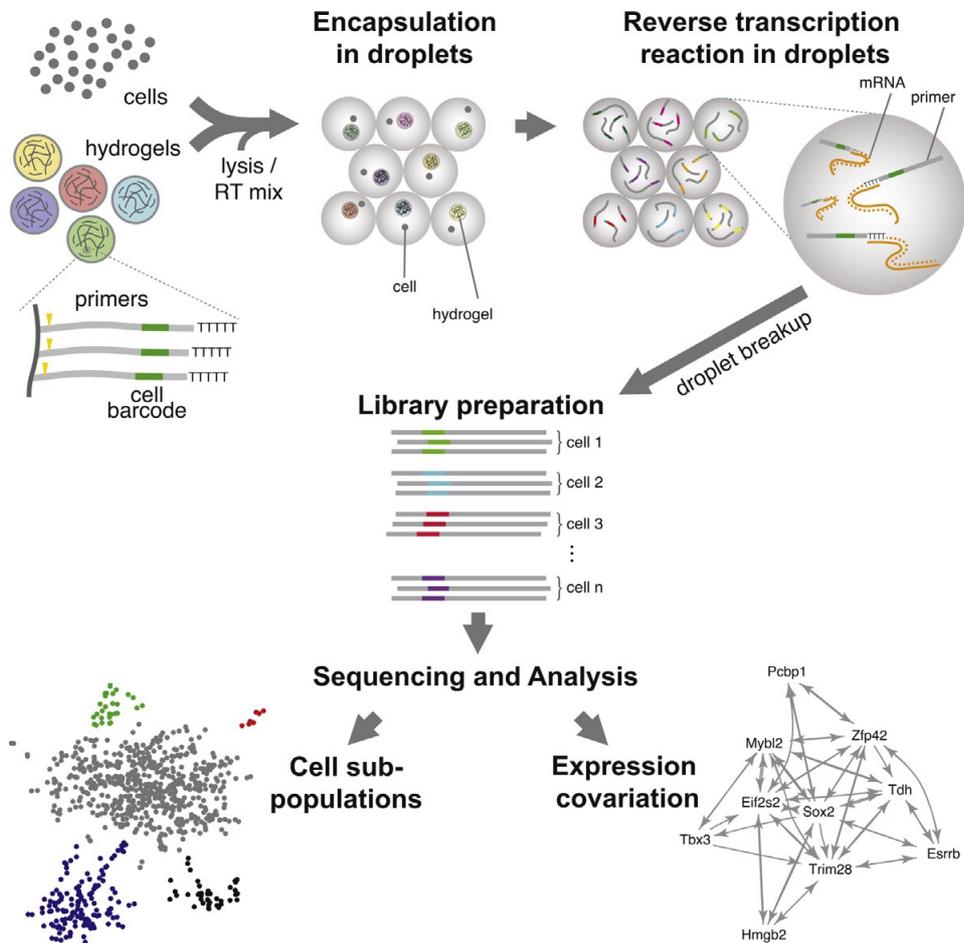


Fig.5: Rappresentazione schematica dell'esperimento eseguito

Tali risultati, ottenuti in topi wild type, saranno utili per studiare la componente stromale di modelli murini transgenici che riproducono alterazioni del sistema ematopoietico, osseo o del metabolismo. Un esempio è costituito dai mutanti Prep1 ipomorfi, nei quali stiamo indagando il contributo del tessuto stromale all'ematopoiesi difettiva che li caratterizza.