

## **EuroClone: Guida al mondo delle iPSC**

## Induced Pluripotent Stem Cells

Le iPSC sono cellule pluripotenti generate da cellule somatiche adulte. Sono state ottenute per la prima volta nel 2006 dal Dr. Yamanaka con un sistema retrovirale codificante 4 fattori di trascrizione in grado di attivare la riprogrammazione, a partire da cellule epiteliali di topo adulto.

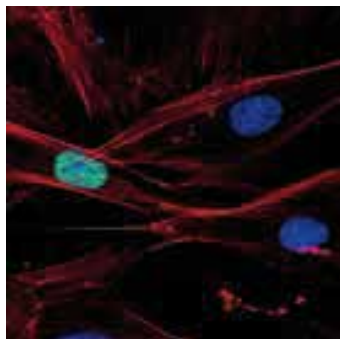
Le iPSC "cellule staminali pluripotenti indotte" rappresentano oggi una delle scoperte più promettenti nell'ambito della medicina rigenerativa, poiché possiedono l'assetto genetico del paziente, ma mantengono la capacità di propagarsi indefinitamente, rappresentando una potenziale fonte di cellule per la riparazione tissutale.

Già ampiamente utilizzate per studi di differenziamento in vitro, si apre ora la sfida per applicazioni in vivo. Rappresentano inoltre una valida alternativa all'utilizzo degli embrioni in ricerca.

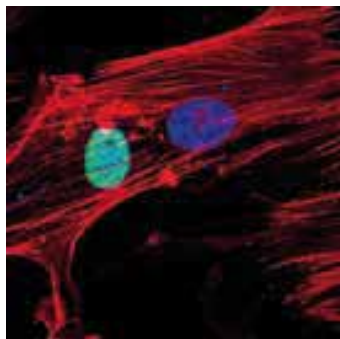
## iPSC Reprogramming

I fattori di riprogrammazione possono essere introdotti direttamente, oppure attraverso sistemi episomali non-integranti, o sistemi retrovirali integranti. I geni trasdotti includono i regolatori trascrizionali Oct-3/4 (Pouf51) e Sox2, e altri fattori che migliorano l'efficienza dell'induzione. Dopo 3/4 settimane, si osserva lo sviluppo di colonie morfologicamente e biochimicamente simili alle staminali pluripotenti, che possono essere isolate tramite selezione morfologica, tempi di divisione, o attraverso un gene reporter e selezione tramite antibiotico.

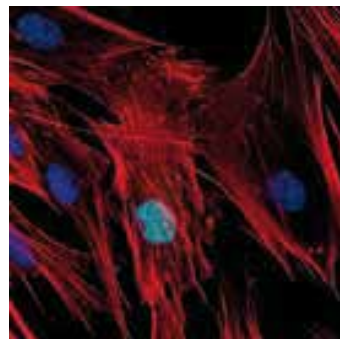
Oct-4A



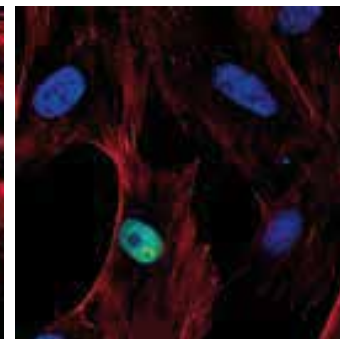
Sox2



c-Myc



KLF4



Confocal immunofluorescent analysis of lentiviral transduced human fibroblast cells using Oct-4A (C30A3) Rabbit mAb #2840, Sox2 (D6D9) XP® Rabbit mAb #3579, c-Myc (D84C12) XP® Rabbit mAb #5605, and KLF4 Antibody #4038 (green). Actin filaments have been labeled with DyLight™ 554 Phalloidin #13054 (red). Blue pseudocolor = DRAG5® #4084 (fluorescent DNA dye).

## 2. Caratterizzazione della pluripotenza

**Cell Signaling Technology (CST)** offre una gamma completa di anticorpi per i più noti marker di iPSC e cellule staminali embrionali (Oct-4, Sox-2, Nanog, etc.): la mancata espressione di un marcatore indica la perdita dello stato di indifferenziamento della cellula.

**StemLight™ Pluripotency Antibody kit** contiene anticorpi specifici per i più comuni marcatori delle cellule staminali. Sono inoltre disponibili kit per misurare l'espressione di fattori di reprogramming, fattori di trascrizione e marcatori di superficie. Tutti gli anticorpi forniti sono ottimizzati e validati per immunofluorescenza e altre applicazioni.

Sul sito [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com) la gamma completa di anticorpi e kit disponibili.

**System Biosciences (SBI)** offre un kit "dual-color" per analisi istochimica di cellule in coltura, oltre a una gamma di Reporter fluorescenti (plasmidi o virus) per Oct4, Sox2 e Nanog umani e murini.

In risposta alla presenza del fattore di pluripotenza, i vettori esprimono un marker di fluorescenza (GFP o RFP) e/o di resistenza antibiotica (Zeocina).

## 3. Mantenimento in Coltura

Per il mantenimento in coltura delle cellule staminali e delle iPSC sono disponibili terreni dedicati, che consentono di propagare le cellule preservando il loro stato indifferenziato.

Nel pacchetto di prodotti **EuroClone** sono disponibili:

- terreno serum free per l'espansione di cellule staminali umane mesenchimali;
- terreno basale da usare in abbinamento con supplementi tipo N2, Neuromix, G5 e altri, per la crescita di cellule neurali staminali adulte ed embrionali;
- terreno per la coltivazione di sferoidi da cellule di tumore primario;
- terreno e il supplemento LIF per l'espansione di mESC.

A completamento del pacchetto, **SBI** offre una serie di terreni chimicamente definiti, supplementi e fattori di crescita per il mantenimento e la crescita delle cellule IPS umane e murine.

**Greiner** ha sviluppato una superficie in polistirene particolarmente indicata per la coltura di cellule staminali e per cancer stem cells (CSC) in grado di inibire l'adesione.

Per la criopreservazione delle iPSC è consigliabile l'impiego di un prodotto specifico, come Advanced STEM Cryopreservation medium di **Ge/Hyclone**.

## 1. Generazione di iPSC

### Reprogramming retrovirale

Fibroblasti umani o murini vengono trasdotti con un pool di particelle virali contenenti i fattori di riprogrammazione, al fine di ottenere iPSC di alta qualità, che non necessitano di selezione mediante antibiotico o marcatore fluorescente, grazie all'integrazione del vettore. Il processo richiede circa 6 settimane e le iPSC possono poi essere espanse per la caratterizzazione con i marker di staminalità.

### Episomal iPSC Reprogramming System

Il sistema episomale di System Biosciences consente di generare iPSC attraverso una tecnologia non virale, non integrante, basata su un'unica trasfezione di plasmidi episomali per Oct4, Sox2, Lin28, Klf4, L-Myc, p53shRNA, e cluster miR-302/367, clonati nel vettore oriP/EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1). La riprogrammazione può avvenire in condizioni feeder-free o feeder-dependent.

Il sistema è alternativo al classico reprogramming virale, che pur essendo un metodo efficiente per lavorare in vitro, non risulta adatto ad applicazioni in vivo.

I plasmidi episomali vengono persi spontaneamente in percentuale pari al 5% per ogni divisione cellulare. Le iPSC transgene-free così ottenute possono essere utilizzate per una vasta gamma di applicazioni, incluse la ricerca preclinica e la sperimentazione clinica.

Lonza propone la formulazione L7™ hiPSC Reprogramming e hPSC Culture System, Xeno-free completa e pronta all'uso, per la generazione di iPSC e per il mantenimento e lo sviluppo di cellule umane iPSC o di cellule embrionali staminali (ESC).

## Cellule Primarie

Qualora cellule derivate dai pazienti non siano disponibili per la generazione di iPSC, è possibile impiegare cellule primarie per la riprogrammazione: Lonza fornisce un ampio pacchetto di cellule primarie sane e patologiche, adatte a questa applicazione.

### Linee cellulari di controllo

Applied StemCell e System Biosciences offrono un'ampia gamma di linee ESC e iPSC da diversi organismi, comprese iPSC umane generate mediante vettori retrovirali o episomali, oltre a cellule staminali neuronali e cardiache derivate da iPSC umane o suine. Sono inoltre disponibili linee cellulari derivate da soggetti normali e pazienti (diabete, MLD, distrofia muscolare, glioblastoma, ALS, Parkinson's,...).

## Service

Applied StemCell fornisce servizi di generazione di iPSC da colture primarie, ottenute per esempio da fibroblasti da pazienti, mediante biopsia cutanea.

## PBMC

La formulazione L7™ PBMC Reprogramming Bundle di Lonza è stata appositamente studiata per ottenere mediante "nucleofezione" la riprogrammazione di cellule somatiche umane da sangue periferico, sempre mediante l'impiego di vettori episomali.

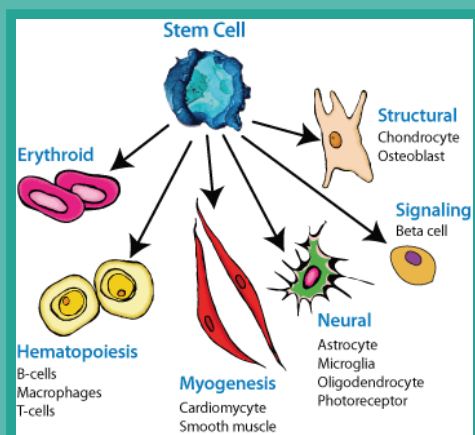
Lonza può fornire anche le cellule primarie PBMC per la riprogrammazione.

## 4. Differenziamento

**Applied StemCell** fornisce soluzioni per il differenziamento di ESC e iPSC in cellule neuronali, dendritiche ed endoteliali.

EuroClone ha sviluppato quattro terreni per il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in:

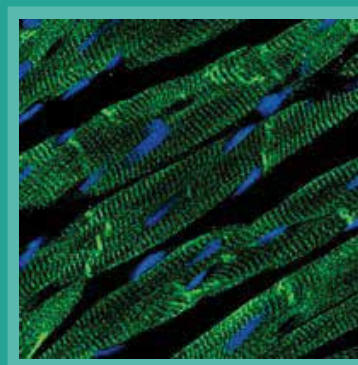
- condrociti
- osteociti
- adipociti
- cellule beta pancreatiche.



## 5. Caratterizzazione del differenziamento

Per monitorare il differenziamento delle iPSC nelle diverse linee cellulari, CST offre anticorpi che consentono di valutare l'espressione di marker "lineage-specifici" e di studiare i pathway che regolano il differenziamento.

SBI propone sistemi lentivirali per monitorare in tempo reale il differenziamento, utilizzando reporter fluorescenti (plasmidi e virus) per il differenziamento in cellule ematopoietiche, muscolari, ossee e cellule Beta e un kit di qPCR dedicato al lineage neuronale.



Confocal immunofluorescent analysis of rat heart using Desmin Antibody (green). Blue pseudocolor = DRAQ5® #4084 (fluorescent DNA dye).

**Generazione di iPSC**

SBSC900A1	Episomal iPSC Reprogramming System	5 reactions
LOCC2702	Human Peripheral Blood Mononuclear Cells	≥ 50 Million Cells
LOFP5124 L7™	PBMC Priming-Recovery Kit (basal medium, enhancer A and enhancer B)	24 reactions
LOV4XP3024	P3 Primary Cell 4D-Nucleofactor™ kit (100 µl Nucleocuvette)	24 reactions
LOFP5007 L7™	hPSC Media Bulletkit™ (basal media and supplement)	500 ml + 5 ml
LOFP5020 L7™	hPSC Matrix	1 mg
LOFP5013 L7™	hPSC Passaging Solution	100 ml

**Caratterizzazione della pluripotenza**
**Antibody Staining**

BK9656S	StemLight™ Pluripotency Antibody Kit	1 kit
BK9092S	StemLight™iPS Cell Reprogramming Antibody Kit	1 kit
BK9093S	StemLight™iPS Transcription Factor Antibody Kit	1 kit
BK9094S	StemLight™iPS Pluripotency Surface Marker Antibody Kit	1 kit
SBSABKIT1	Complete Antibody and AP staining Kit (hOct4, hNanog, hTRA-1-60, hSSEA-3 antibodies and AP Red staining Kit)	Kit
SBAP100D1	Dual- Color AP Staining Kit	100 Assays

Sul sito [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com) la gamma completa di anticorpi e kit disponibili.

**Promoter Reporters: Plasmid Lentivectors**

Disponibili per diversi fattori trascrizionali e con diversi marker. Visita il sito [www.systembio.com](http://www.systembio.com) per un elenco completo.

SBSR20070PA1	Oct4 CR4-pGreenFire Response Reporter	10 µg
SBSR20071PA1	Sox2 SRR2-pGreenFire Response Reporter	10 µg
SBSR10030PA1	Human Nanog Reporter (pGreenZeo, plasmid)	10 µg
SBSR10033PA	Human Oct-4 Reporter (pGreenZeo, plasmid)	10 µg

**Mantenimento in Coltura**
**EuroMed Family media for stem cell research - EuroClone**

Terreni per il mantenimento e l'espansione di cellule staminali.

ECM0889L	EuroMed MSC serum free	500 ml
ECM0883L	EuroMed-N optimized medium for neuronal precursor cells	500 ml
ECM0894D	EuroMed CSC Spheres	100 ml
ECM088L	EuroMed-mES optimized medium for murine ES cells	500 ml
ECM0800A	EuroMed-mLIF supplement for EuroMed-mES medium (107U/ml)	1 ml

**ESC/iPSC Growth Medium and supplements - System Biosciences** - Visita il sito [www.systembio.com](http://www.systembio.com) per una lista completa di fattori di crescita

SBSC500M1	PSGro Human ESC/iPSC Growth Medium (for feeder-free conditions)	500 ml
SBSC200M1	Mouse iPSC Growth Medium	500 ml
SBSC551M1	PSGen Reprogramming Supplement (1000x)	500 µ
SBSC300M1	Gentle-Stem Enzyme-Free Human ESC/iPSC Dissociation Solution	500 ml

**Cryopreservation medium - Hyclone/GE**

Terreno per il congelamento delle cellule staminali

SH3089401	Advance STEM Cryopreservation medium	100 ml
-----------	--------------------------------------	--------

**Supporti per la crescita - Greiner Bio-One** - Sul sito [https://www.gbo.com/en\\_INT.html](https://www.gbo.com/en_INT.html) la gamma completa di prodotti

GR657970	6 wells multiwell plates, with lids, cell repellent	1/5
GR655970	96 wells multiwell plates, flat bottom with lids, cell repellent	1/6
GR628979	60/15mm culture dish, cell repellent	10/20
GR627979	35/10mm culture dish, cell repellent	10/40

**Differenziamento**
**EuroMed Family media for stem cell research - EuroClone**

Terreni per il differenziamento delle mesenchimali.

ECM0890K	EuroMed Chondrogenic differentiation kit	100 ml + 5 ml
ECM0891K	EuroMed Adipogenic differentiation kit	500 ml + 50 ml
ECM0892K	EuroMed Osteogenic differentiation kit	500 ml + 50 ml
ECM0893K	EuroMed Genesis Beta Cells Serum free kit	100 ml + 1 ml

**Kit per il differenziamento in c. neuronali e dentritiche - Applied StemCell**

Visita il sito <http://www.appliedstemcell.com> per un elenco completo dei kit e servizi offerti

SK9303	hESC/iPSC - Neural Progenitor Cell Generation Kit	5 reaz.
ASK9304	hESC/iPSC - Neural Stem Cell Generation Kit	5 reaz.

**Caratterizzazione del differenziamento**
**Reporter fluorescenti e per il differenziamento - System Biosciences**

Visita il sito [www.systembio.com](http://www.systembio.com) per una lista completa. Disponibili anche le particelle virali pre-packaged.

Reporter fluorescenti per uomo e topo in diversi formati.

SBSR10032PA1	Human LCK Differentiation Reporter (pGreenZeo, Plasmid)	10 µg
SBSR10011PA1	Human MLC-2v Differentiation Reporter (pGreenZeo, Plasmid)	10 µg
SBSR10015PA1	Human GFAP Differentiation Reporter (pGreenZeo, Plasmid)	10 µg
SBSR10028PA1	Human Insulin Differentiation Reporter (pGreenZeo, Plasmid)	10 µg

**Neural qPCR Array - System Biosciences**

Kit completo per la determinazione dello stato di differenziamento di linee neuronali.

SBRA500A1	Neural Lineage qPCR profiler	10 reaz.
-----------	------------------------------	----------

Ed0/0216/PR 1012\_iPCS

**EuroClone S.p.A.**

Via Figino, 20/22 • 20016 Pero (MI) Italy • ☎ +39 02 38195.1 • 📠 +39 02 38101465 • ✉ info@euroclone.it • www.euroclone.it

Quality Management Systems certified according to ISO 9001 and ISO 13485 international standards