

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE MOTORIE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

L'epcidina e il suo ruolo nell'omeostasi del ferro a livello cardiaco

Presentata da:

Riccardo Ruggeri

Relatore:

Prof.ssa Marina Marini

Matricola n°

0000698457

Sessione I

Anno accademico 2015/2016

Indice

1. Introduzione.....	3
1.1 L'omeostasi del ferro	3
1.1.1 MECCANISMI DI REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELL'OMEOSTASI DEL FERRO	4
1.1.2 L'EPCIDINA	5
1.2 L'epcidina e il suo ruolo a livello cardiaco	7
1.2.1 L'IPOSSIA E L'OMEOSTASI DEL FERRO	7
1.2.2 L'ATASSIA DI FRIEDREICH (FRDA): UNA PATOLOGIA DA SOVRACCARICO DI FERRO.....	7
1.3 Scopo della tesi	10
2. Materiali e metodi.....	11
2.1 Cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSCs).....	11
2.1.1 COLTURA DI hiPSCs SU FEEDER LAYER	11
2.1.2 COLTURA DI hiPSCs IN CONDIZIONI FEEDER-FREE.....	13
2.1.3 DERIVAZIONE DI CARDIOMICITI DA hiPSCs (metodo GiWi)	13
2.1.4 CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO DELLE hiPSCs.....	15
2.2 Modello animale, protocollo di Ipossia Intermittente (IH) e legatura coronarica (LAD) 17	
2.3 Analisi di espressione genica nei cardiomiociti indotti da hiPSCs e nel modello animale, mediante qRT-PCR	18
2.3.1 ESTRAZIONE DELL'RNA MEDIANTE TRIzol.....	18
2.3.2 CONTROLLO DELL'INTEGRITÀ DELL'RNA MEDIANTE CORSA ELETTROFORETICA	19
2.3.3 VERIFICA DELLA PRESENZA DI DNA GENOMICO MEDIANTE PCR DI CONTROLLO	20
2.3.4 TRATTAMENTO CON LA DNasi I	22
2.3.5 PCR DI CONTROLLO POST-TRATTAMENTO CON LA DNasi I.....	22
2.3.6 QUANTIFICAZIONE DELL'RNA	23
2.3.7 REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE	23
2.3.8 QUANTIFICAZIONE DEL cDNA	24
2.3.9 DESIGN DEI <i>PRIMER</i>	24
2.3.10 qRT-PCR DEI GENI REGOLATORI DELL'OMEOSTASI DEL FERRO.....	26
3. Risultati	28
3.1 Cardiomiociti derivati da hiPSCs.....	28
3.2 Modello murino sottoposto a ipossia intermittente (IH) e legatura coronarica (LAD)	29
4. Discussione	32
5. Bibliografia	35

1. Introduzione

1.1 L'omeostasi del ferro

Il ferro è uno dei micronutrienti essenziali alla vita di molte specie viventi ed è considerato il metallo più comunemente usato nei sistemi biologici. Infatti, nell'uomo come negli altri vertebrati, molti processi fisiologici si basano sulla disponibilità di proteine contenenti ferro. Quest'ultime ad esempio sono coinvolte nel trasporto dell'ossigeno, nella respirazione cellulare, in vari passaggi del metabolismo e in alcune strategie di difesa dell'organismo.

L'omeostasi del ferro prevede una fine regolazione dell'assorbimento, ma non presenta meccanismi attivi per quanto riguarda l'escrezione. La quantità di ferro giornaliero che viene persa, è recuperata attraverso l'assorbimento a livello duodenale (3-5 mg/giorno) o mediante il riciclo di ferro contenuto negli eritrociti fagocitati (20-25 mg/giorno). Il ferro ingerito con la dieta si trova sotto forma di idrossido ferrico o è associato a molecole organiche; quando raggiunge il duodeno, viene assorbito sul lato luminale degli enterociti. In questo lato della membrana è presente il trasportatore di ioni metallici divalenti 1 (DMT1), che sfrutta il gradiente elettrochimico creato dallo scambiatore duodenale Na^+/H^+ , per generare un simporto protoni/ferro ferroso (Fe^{2+}) in grado di assorbire il ferro necessario all'organismo. Visto che l'assorbimento del ferro è possibile solo quando si trova nello stato di ossidazione 2^+ , sul lato luminale degli enterociti si trova anche una ferro-reduttasi simile al citocromo b (Dcytb), che riduce il ferro ferrico (Fe^{3+}) assorbito con la dieta in ferro ferroso. A questo punto, parte del ferro entrato nell'enterocita riesce a oltrepassare la membrana basolaterale e ad entrare nel plasma sfruttando l'azione della proteina multitransmembrana definita ferroportina 1. Quest'ultima è espressa anche nei macrofagi reticoloendoteliali, negli epatociti e nei trofoblasti della placenta. L'efflusso di ferro, come l'importazione, necessita il cambio di stato d'ossidazione del ferro, infatti, la ferroportina 1 esporta il Fe^{2+} , ma questo viene subito ossidato a ferro ferrico dall'efestina per permettergli di legarsi alla proteina che trasporta il ferro nel plasma, chiamata transferrina. Nel caso dei macrofagi e degli epatociti, la funzione dell'efestina è svolta dalla ceruloplasmina. La transferrina è una glicoproteina del plasma di 80 KDa, che viene sintetizzata nel fegato e secreta dagli epatociti. La velocità di sintesi di questa proteina dipende dalle riserve di ferro dell'organismo, in particolare, la transferrina è poco espressa quando vi è molto ferro a disposizione. In condizioni fisiologiche, tutte le molecole di transferrina hanno un terzo dei siti di legame occupato, in questo modo sono capaci di compensare un eventuale aumento del livello di ferro plasmatico. Ogni molecola di transferrina è fornita di due siti di legame per il ferro,

ognuno dei quali lega un atomo di ferro trivalente (ferrico) con una costante di affinità pari a $1,6 \cdot 10^{22}$. Il ferro trasportato nel plasma può raggiungere ogni cellula ed essere assorbito se la membrana cellulare di quest'ultima è provvista dei recettori per la transferrina (TfR). TfR1 è un recettore diffuso in vari tessuti ed è costituito da un omodimero glicoproteico, provvisto di un solo dominio transmembrana per ogni subunità. A pH fisiologico, l'affinità di TfR1 è maggiore per la transferrina diferrica e ogni subunità dell'omodimero è in grado di legare due molecole di transferrina. Il recettore TfR2, invece, lega con meno affinità la transferrina ed è espresso maggiormente nel fegato. Grazie al legame con il recettore, la transferrina subisce l'endocitosi e si trova in un ambiente leggermente acidificato attraverso l'importazione di protoni nella vescicola endocitotica (pH 5-6). L'abbassamento del pH libera il ferro dalla transferrina e rafforza l'interazione TfR-apotransferrina. A questo punto, il ferro ferrico nella vescicola viene ridotto e trasportato nel citosol da DMT1, mentre l'apotransferrina ancora legata al recettore viene esposta all'ambiente extracellulare, affinché il pH fisiologico permetta la sua liberazione, necessaria per legare nuovi atomi di ferro. Il ferro ferroso, che viene introdotto nel citosol delle cellule attraverso questo meccanismo, è immagazzinato grazie all'azione della ferritina. Questa proteina viene sintetizzata sotto forma di apoferritina, una sfera di diametro 13 nm con una cavità centrale di 6 nm, in grado di comunicare con la superficie attraverso sei canali, da cui possono entrare e uscire gli atomi di ferro. L'apoferritina ha un peso molecolare prossimo ai 400-500 KDa e riesce a contenere fino a circa 4500 atomi di ferro. Lo scheletro della proteina è costituito da 24 monomeri di due distinte subunità, chiamate catena pesante (Ferritina H) e catena leggera (Ferritina L), che possono trovarsi in proporzione diversa in base allo stato fisiologico o patologico della cellula. La subunità H è dotata di un centro ferro-ossidasi, assente nella subunità L, che permette alla ferritina di svolgere la sua azione antiossidante. Infatti, il ferro ferroso presente nel citosol viene ossidato dall' O_2 all'interno della ferritina e viene conservato sotto forma di ferro ferrico, riducendo la sua tossicità; questa è infatti associata al fatto che il ferro ridotto ha la possibilità di combinarsi con il perossido di idrogeno per formare specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle reazioni di Fenton [1].

1.1.1 MECCANISMI DI REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELL'OMEOSTASI DEL FERRO

L'omeostasi del ferro ha due livelli di regolazione, uno locale e uno sistemico. Il primo si basa sulla regolazione post-trascrizionale degli mRNA che codificano per le proteine implicate nell'importazione e nello *storage* del ferro. In questo processo sono coinvolte le proteine regolatrici del ferro (IRP1/2), le quali assumono funzioni diverse in base al livello di ferro intracitoplasmatico che percepiscono. Quando la cellula si trova in sovraccarico di ferro, il cluster 4Fe-4S contenuto in

IRP1 viene saturato; ciò determina la conversione della proteina IRP1 in una aconitasi citosolica; inoltre, la proteina IRP2 legata al ferro viene poliubiquitinata e degradata. In queste condizioni le IRPs non possono attaccarsi agli elementi responsivi del ferro (IREs), costituiti da strutture a forcina presenti al 5' o al 3' di alcuni mRNA. Perciò, il sovraccarico di ferro da un lato favorisce lo stoccaggio e l'esportazione del ferro e dall'altro inibisce l'importazione di altri atomi di ferro. Nei trascritti che possiedono l'IRE al 5', come quelli codificanti per la ferritina e la ferroportina 1, la presenza delle IRPs impedisce l'attacco del ribosoma e di conseguenza la loro traduzione. Invece, i trascritti dei recettori della transferrina e di DMT1, che possiedono l'IRE al 3', sono stabilizzati dalla presenza delle IRPs. Di conseguenza, quando la cellula si trova in carenza di ferro, IRP1 perde la sua attività di aconitasi e IRP2 non viene degradata, quindi entrambe possono attaccarsi ai rispettivi IREs. In questo caso è facilitato l'accumulo di ferro, mentre vengono ridotti lo *storage* e l'esportazione. La regolazione dell'omeostasi del ferro a livello sistemico, invece, è svolta dall'ormone peptidico epcidina [1].

1.1.2 L'EPCIDINA

L'epcidina, è stata scoperta da Park *et al.* (2001), ed è stata purificata dalle urine umane come un peptide di origine epatica costituito da 25 a.a., legati fra loro da quattro ponti disolfuro. Grazie alla sua struttura, questo peptide fu inizialmente inserito nella famiglia delle defensine, un gruppo di peptidi cationici antimicrobici, essenziali per i meccanismi dell'immunità innata. Infatti, fu dimostrato che l'epcidina era in grado di indurre la lisi di vari batteri e inibire la germinazione di muffe e funghi. I primi studi, inoltre, confermarono che il peptide trovato nelle urine corrispondeva alla forma matura dell'epcidina che si ottiene grazie a due eventi di taglio sequenziali. Il primo avviene tra la Gly24 e la Ser25 e trasforma il pre-propeptide di 84 a.a nel propeptide di 60 a.a; mentre il secondo è operato in prossimità dell'Arg59 e dà origine al trascritto dell'epcidina maturo [19]. In seguito, l'epcidina è stata associata alla regolazione a livello sistemico del ferro. Infatti, questo peptide è in grado di legarsi alla ferroportina 1 degli enterociti e dei macrofagi reticoloendoteliali, innescando un processo d'internalizzazione e degradazione dell'esportatore del ferro. Perciò, l'aumento di epcidina genera inizialmente uno stato d'ipoferremia e successivamente induce la deplezione delle riserve di ferro per compensare quello che non può essere assorbito a livello intestinale. Ovviamente, anche il livello di espressione dell'epcidina nel fegato è tenuto sotto controllo, attraverso tre meccanismi distinti che dipendono rispettivamente dalla concentrazione di ferro, dall'eritropoiesi e dall'infiammazione. La regolazione ferro-dipendente si basa sulla capacità degli epatociti di percepire la quantità di ferro legata alla transferrina nel plasma. A questo scopo, gli epatociti espongono i sensori dell'olotransferrina (diferrica) costituiti da TfR1, TfR2 e dalla

proteina dell'emocromatosi umana (HFE). Quando vi è un eccesso di ferro legato alla transferrina, quest'ultima riesce a escludere HFE dal sito di legame di TfR1 e favorire il suo legame a TfR2. Il complesso TfR2/HFE/olotransferrina che viene a formarsi è in grado di potenziare l'affinità del recettore delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMPR) per il suo ligando BMP6, probabilmente attraverso il contatto con il corecettore chiamato emojuvelina. Grazie al legame tra BMP6 e il suo recettore viene innescato il pathway di Smad che alla fine aumenta i livelli di espressione dell'epcidina. Inoltre, vi è un altro effettore coinvolto nella regolazione ferro-dipendente e viene definito matriptasi-2 (MT-2 o TMPRSS6); si tratta di una proteasi, che in condizioni di carenza di ferro, è in grado di degradare l'emojuvelina, destabilizzando il complesso recettoriale. Il secondo meccanismo di regolazione dell'epcidina si osserva in condizioni di stress eritropoietico (emorragia, crisi emolitica), cioè quando l'organismo necessita di più ferro da investire nella generazione di eritrociti. In questa situazione, l'assorbimento del ferro aumenta, quindi la concentrazione di epcidina diminuisce attraverso un meccanismo non completamente chiarito che potrebbe basarsi sulla regolazione trascrizionale indotta da HIF-1 α . Infine, l'epcidina viene regolata durante l'infiammazione mediante il pathway JAK/STAT3 indotto da interleuchina-6 (IL-6). Questa via di segnalazione aumenta la trascrizione dell'epcidina, quindi diminuisce l'assorbimento di ferro e lo sequestra nei macrofagi per impedire che i batteri riescano a proliferare sfruttando la sua presenza [1] [6].

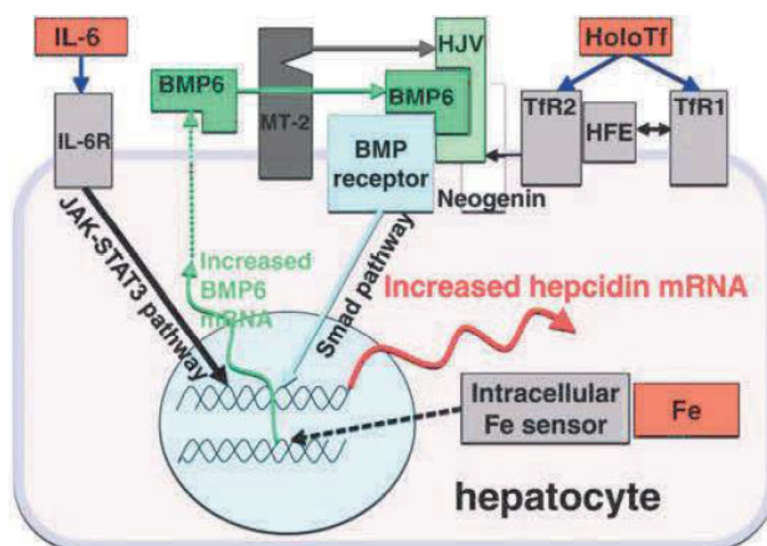


Figura 1: Vie di regolazione trascrizionale dell'epcidina [1]

1.2 L'epcidina e il suo ruolo a livello cardiaco

1.2.1 L'IPOSSIA E L'OMEOSTASI DEL FERRO

I meccanismi che associano la variazione della quantità di O₂ (ipossia e ischemia) all'alterazione dell'omeostasi del ferro non sono stati del tutto chiariti, ma sono state proposte varie teorie al riguardo. Ad esempio, lo studio condotto da Merle *et al.* (2007), ha confrontato gli effetti dell'ipossia cronica e dell'infiammazione sull'espressione dell'epcidina, a livello epatico e cardiaco. I ratti sono stati sottoposti all'ipossia cronica (6-8% di O₂) per 24 ore o 5 giorni prima del sacrificio, mentre lo stato infiammatorio è stato indotto mediante una singola iniezione di trementina. I risultati ottenuti mostrano che, durante l'ipossia cronica, l'espressione dell'epcidina nel fegato è ridotta, quindi è favorito l'assorbimento di ferro da parte del duodeno. A livello cardiaco, invece, la trascrizione dell'epcidina è aumentata, ed è stato ipotizzato che questo fenomeno possa stimolare la maggiore sintesi di ferritina riscontrabile durante l'ischemia cardiaca. In questo modo, l'epcidina potrebbe partecipare a un meccanismo coordinato per proteggere le cellule dalla tossicità dei radicali liberi, sequestrando il pool di ferro labile citosolico che viene prodotto nell'ischemia. Durante l'infiammazione, invece, è stato evidenziato un aumento dell'epcidina sia a livello epatico sia a livello cardiaco. Infatti, l'organismo sfrutta l'azione antimicrobica dell'epcidina per sequestrare il ferro necessario alla crescita dei batteri in entrambi gli organi [18]. Lo studio condotto da Bulvik *et al.* (2012) ha proposto l'esistenza di un "segnale del ferro" che si sviluppa durante periodi di breve ischemia (2 minuti). Il "segnale del ferro" consiste in un meccanismo cellulare che libera piccole quantità di ferro degradando parte della ferritina citosolica, affinché la cellula percepisca un accumulo di ferro acuto ed esprima nuova apoferritina. L'apoferritina prodotta in questo modo, agisce come fattore cardioprotettivo compensando la grande quantità di ferro che entra nel pool labile durante un evento ischemico prolungato. Di conseguenza, è ridotta al minimo la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), una delle cause principali associate al danno da ischemia-riperfusionazione (I/R) [4].

1.2.2 L'ATASSIA DI FRIEDREICH (FRDA): UNA PATOLOGIA DA SOVRACCARICO DI FERRO

L'atassia di Friedreich (FRDA) è una patologia autosomica recessiva, con un'incidenza stimata a 1:50000, caratterizzata dalla neurodegenerazione progressiva di varie aree del sistema nervoso centrale e periferico. Infatti, con il progredire della malattia si osservano la perdita della percezione vestibolare, la mancanza di riflessi basilari e una debolezza motoria diffusa. Inoltre, due terzi dei pazienti sviluppano una cardiomiopatia ipertrofica, associata a ispessimento del ventricolo sinistro e

del setto interventricolare, con presenza di depositi di ferro all'interno delle fibre muscolari. La cardiomiopatia è la causa di morte più frequente tra i pazienti di FRDA. In più, nel 14-19% dei casi si osserva la presenza di diabete mellito nelle fasi finali della malattia, dovuto all'insulino-resistenza a livelli periferico e non a cause di natura autoimmune.

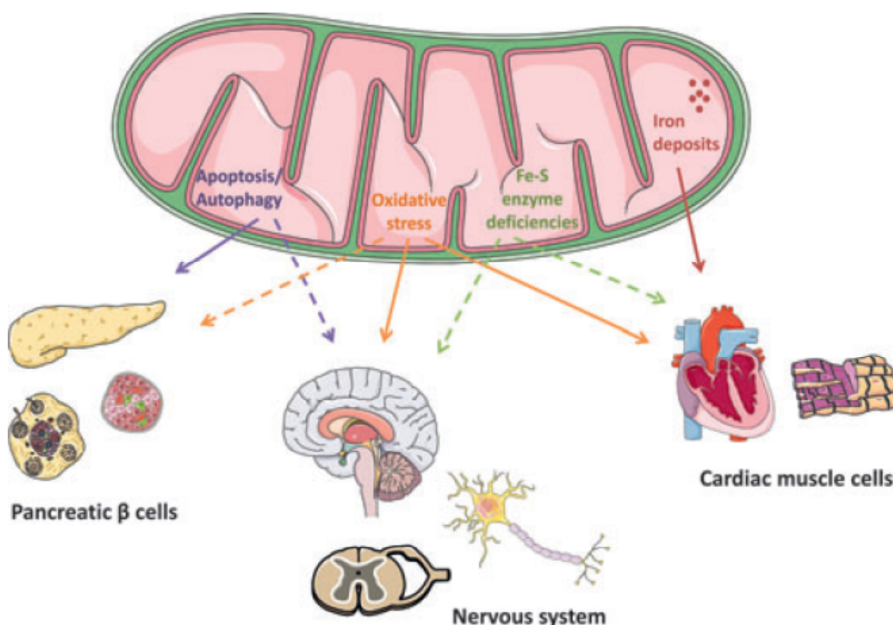


Figura 2: Meccanismi biologici alterati nell'Atassia di Friedreich (FRDA) [8]

L'eziopatogenesi della FRDA è associata all'espansione della sequenza trinucleotidica GAA nel primo introne del gene FXN, codificante per la proteina fratassina. La tripletta GAA è più instabile e soggetta all'espansione quando sono presenti tra le 26 e le 44 ripetizioni, mentre gli alleli che acquisiscono più di 44 ripetizioni sono sempre associati allo sviluppo della FRDA. A livello molecolare, lunghi tratti di triplette ripetute inducono conformazioni triplex di DNA in grado di arrestare e sequestrare la RNA polimerasi, inibendo la trascrizione della fratassina. Inoltre, è stato proposto un meccanismo epigenetico come causa dell'FRDA, poiché a livello delle triplette GAA il DNA risulta condensato in eterocromatina, grazie alla presenza di trimetilazione H3K9 e alla riduzione dell'acetilazione istonica. La fratassina è una proteina conservata evolutivamente, che svolge la sua funzione all'interno della matrice mitocondriale e presenta un folding unico in natura. Infatti, è costituita da un foglietto β -antiparallelo circondato a ogni lato da un' α -elica. Questa struttura le permette di interagire sia con il ferro, attraverso le superfici cariche delle α -eliche, sia con altre molecole di fratassina, grazie alla superficie neutra del β -foglietto. Il deficit di questa proteina provoca alterazioni nella biogenesi dei cluster Fe-S, a livello mitocondriale, influenzando

la funzionalità di molti enzimi della catena respiratoria [17] [20]. Inoltre, si ipotizza che la quantità ridotta di cluster Fe-S prodotti nella FRDA potrebbe generare una maldistribuzione del ferro a livello subcellulare. Infatti, nel tessuto cardiaco dei pazienti è osservabile un accumulo di ferro mitocondriale, che non risulta biologicamente disponibile e che costringe le cellule ad affrontare una carenza di ferro, alterandone l'omeostasi [5]. Pertanto, nei pazienti FRDA, l'assenza di ferro citosolico induce le IPR1/2 a legarsi agli IREs per favorire la trascrizione di TfR1 e inibire quella della ferroportina 1. L'eccesso di ferro mitocondriale, inoltre, è dannoso per le cellule perché causa l'accumulo di radicale ossidrilico ($\text{OH}\cdot$), attraverso la reazione di Fenton. La riduzione di fratassina, riscontrata nella FRDA, promuove anche una condizione favorevole allo sviluppo di stress ossidativo mediante diversi meccanismi. Infatti, si riscontra ipersensibilità agli ossidanti, incapacità di mobilitare gli enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD) e la glutatione perossidasi e alterazione dell'omeostasi del glutatione [8]. Il ruolo dell'epcidina nell'eziopatogenesi dell'FRDA, invece, non è stato ancora del tutto chiarito, ma uno studio recente condotto da Levi *et al.* (2015) ha evidenziato un possibile meccanismo d'azione. Infatti, la miocardite connessa alla cardiomiopatia della FRDA è stata associata alla presenza di monociti CD68^+ /epcidina⁺, in grado di attaccarsi alla membrana cellulare dei cardiomiociti mediante pseudopodi e indurne la necrosi. Inoltre, l'epcidina individuata nell'infiltrato infiammatorio potrebbe impedire parzialmente l'esportazione di ferro tramite ferroportina 1 nei macrofagi, contribuendo in parte al danno cardiaco tipico della FRDA [10]. Un altro studio condotto da Hsieh *et al.* (2014) sui cardiomiociti umani ha dimostrato il coinvolgimento dell'epcidina nella via apoptotica indotta dal sovraccarico di ferro. In particolare, è stato osservato che l'accumulo di ferro ferroso nel citoplasma è accompagnato dall'aumento di espressione del gene HAMP e dalla riduzione dei trascritti codificanti per i fattori anti-apoptotici GATA4, Bcl-2 e Bcl-xL. Inoltre, dopo la trasfezione di un siRNA per indurre il silenziamento dell'epcidina, è stato osservato che la riduzione dei fattori di sopravvivenza, causata dal sovraccarico di ferro, viene ulteriormente accentuata. Questo risultato dimostra che l'aumento di espressione del gene HAMP, riscontrato nel sovraccarico di ferro, potrebbe avere un effetto cardioprotettivo, proteggendo i cardiomiociti dall'apoptosi [9].

1.3 Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è stato quello di approfondire le conoscenze riguardo al ruolo dell'epcidina (HAMP) e il suo coinvolgimento a livello cardiaco. Numerosi sono gli studi sulla funzione dell'epcidina, soprattutto sul fegato, la sua sede di sintesi, e sull'intestino, dove agisce per regolare l'assorbimento di ferro; tuttavia, scarse sono le informazioni sul ruolo dell'epcidina anche in altri tessuti, in particolare a livello cardiaco. In uno studio recentemente condotto da Levi *et al.* (2015), è stato evidenziato un aumento della presenza di epcidina nelle biopsie cardiache di pazienti affetti da FRDA. Parallelamente, studi condotti nel laboratorio della prof.ssa Marini hanno evidenziato un aumento di espressione del gene HAMP, codificante l'epcidina, in cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSCs), rispetto a cardiomiociti derivati da hiPSCs di soggetti sani (Ctr). Lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di derivare nuovi cardiomiociti FRDA e Ctr per valutare l'espressione genica di HAMP, aumentare la casistica e validare il dato precedentemente ottenuto. Parallelamente, al fine di approfondire il ruolo dell'epcidina e i geni regolatori del ferro a livello cardiaco, abbiamo usato un modello animale murino sottoposto a un protocollo d'ipossia intermittente (IH) che risulta essere cardioprotettivo, come dimostrato in uno studio da Marini e collaboratori (2013). Infatti, i topi sottoposti a IH e successivamente a un danno ischemico indotto dalla legatura coronarica (LAD), presentavano una riduzione dell'area infartuata rispetto a quelli cresciuti in condizioni di normossia. Pertanto, sarà valutata l'espressione genica di HAMP e dei geni regolatori del ferro anche in questo modello di studio, al fine di comprendere meglio il ruolo dell'epcidina a livello cardiaco.

2. Materiali e metodi

2.1 Cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSCs)

2.1.1 COLTURA DI hiPSCs SU FEEDER LAYER

Una linea cellulare di hiPSCs derivate da soggetti sani (GM 23340*A) e dai pazienti affetti da FRDA (GM23913*B) sono state acquistate da una banca cellulare americana (*Coriell Institute*). Le hiPSCs sono cresciute su un substrato di fibroblasti embrionali murini (MEFs). Le cellule MEFs sono inattivate mitoticamente mediante irradiazione. Il giorno prima della semina delle hiPSCs, i fibroblasti MEFs sono seminati alla densità cellulare di $12,5 \cdot 10^3/\text{cm}^2$ in una piastra da 6 pozzetti trattata con una soluzione di gelatina allo 0,7 %. I feeder layer sono seminati in un terreno costituito da Dulbecco modified eagle's medium (DMEM), siero fetale bovino al 10% (FBS), HEPES, Glutammina (200 mM), amminoacidi non essenziali all'1% (NEAA) e penicillina-streptomicina all'1%.

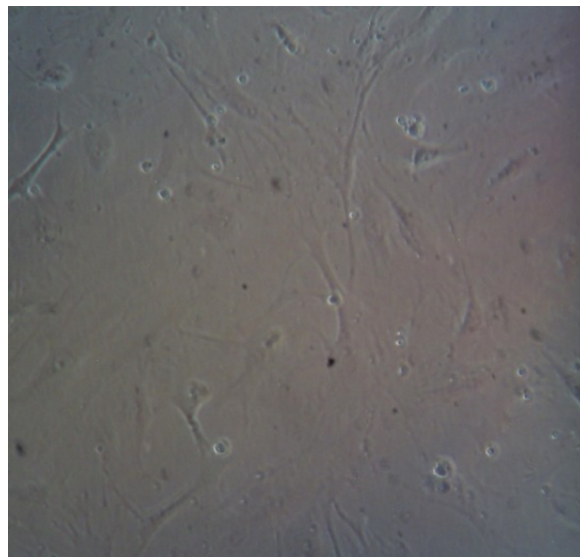


Figura 3: fibroblasti embrionali murini (MEFs) al microscopio a contrasto di fase (ingrandimento 4X)

Le hiPSCs sono coltivate in un terreno costituito da DMEM/F12, KnockOut Serum Replacement al 20% (KSOR), glutammina (2mM), NEAA all'1%, penicillina-streptomicina all'1%, β -mercaptoetanololo (0,1 mM) e bFGF. Quest'ultimo richiede differenti concentrazioni nelle due linee cellulari, in particolare le FRDA-iPSCs sono cresciute con una concentrazione finale di fattore basale di crescita dei fibroblasti (bFGF) di 20 ng/mL, mentre le Ctr-hiPSCs richiedono una c.f. di bFGF cinque volte maggiore pari a 100 ng/mL.

Le hiPSCs coltivate in condizioni feeder layer proliferano come colonie monostratificate di forma circolare separate dalle altre da bordi ben definiti. La proliferazione delle cellule va monitorata giorno per giorno, mediante osservazione al microscopio a contrasto di fase. A volte, possono generarsi colonie eterogenee dal punto di vista morfologico, indice di differenziamento spontaneo e di una potenziale perdita di staminalità. La presenza di una o più colonie alterate potrebbe compromettere il mantenimento della staminalità in tutto il pozzetto. Per evitare che ciò accada, è sufficiente eliminare con una pasteur le colonie con una morfologia anomala, che presentano siti di differenziamento spontaneo.

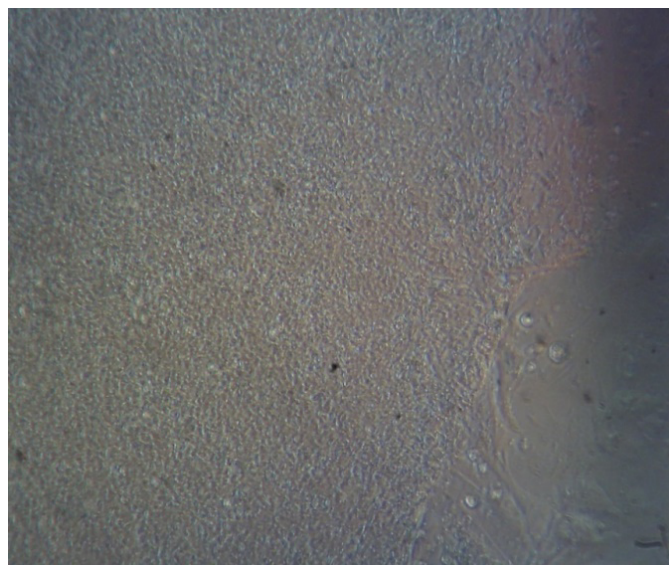


Figura 4: colonia di hiPSCs al microscopio a contrasto di fase (ingrandimento 10X)

In condizioni ottimali le hiPSCs raggiungono l'80-90% della confluenza dopo 5-6 giorni dalla semina e sono pronte per essere divise in una nuova piastra, mediante l'utilizzo di un agente dissociante definito TrypLE Express. Le hiPSCs sono incubate con 1 ml di TrypLE Express per 5 minuti a 37 °C. Al termine dell'incubazione, le cellule vengono recuperate con 1 ml di terreno, per trasferirle in una falcon da 15 ml. La sospensione cellulare viene centrifugata a 200 x g per 2 min. Al termine della centrifuga, il surnatante viene eliminato e il pellet è risospeso in 2,5 mL di terreno fresco con l'aggiunta del Y-27632 10 µM. Quest'ultimo è un inibitore selettivo del pathway di Rho/ROCK (protein-chinasi associata a Rho) che fisiologicamente è coinvolto nell'organizzazione del citoscheletro, ma in questo caso la sua inibizione diminuisce significativamente l'apoptosi indotta da assenza di contatto (anoikisis). Questo tipo di morte cellulare colpisce maggiormente le

hESCs e le hiPSCs rispetto alle cellule staminali derivate da *Mus Musculus*, quindi l'aggiunta di Y-27632 il primo giorno di semina è essenziale per la sopravvivenza cellulare [2] [12] [22].

2.1.2 COLTURA DI hiPSCs IN CONDIZIONI FEEDER-FREE

Le hiPSCs possono essere coltivate in condizioni feeder-free per essere poi utilizzare nella derivazione di cellule cardiache. Le hiPSCs, quando hanno raggiunto la confluenza dell'80-90%, sono incubate con 1 ml di Versene per 4 minuti a 37 °C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono risospese in un terreno definito mTeSR1. Quest'ultimo è un medium serum-free e xeno-free sviluppato da Tenneille Ludwig e collaboratori nel WiCell Research Institute (Madison, WI) e costituito da alti livelli di bFGF, TGF β , acido gamma-amminobutirrico (GABA), acido pipecolico e cloruro di litio. La semina delle cellule in condizioni feeder-free è effettuata in piastre trattate con una soluzione di *BD MatrigelTM hESC-qualified Matrix* ovvero una matrice extracellulare in grado di fornire fattori di crescita.

2.1.3 DERIVAZIONE DI CARDIOMICITI DA hiPSCs (metodo GiWi)

Esistono diversi metodi per indurre le hiPSCs a differenziare in cardiomiociti. Il metodo GiWi, utilizzato in questo studio, si basa sulla modulazione temporale dei regolatori della via canonica di Wnt/ β -catenina [13].

Quando le hiPSCs cresciute in condizioni feeder-free sono prossime alla confluenza sono pronte per essere dissociate con 1 mL di Accutase per 8 minuti a 37 °C. L'aggiunta di Accutase rende possibile singolarizzare le cellule per effettuare la conta cellulare. Al termine dell'incubazione, le cellule sono risospese nel terreno. Si procede poi a prelevare 10 μ L di sospensione cellulare mescolate con 85 μ L di PBS 1X e 5 μ L di eritrosina, per effettuare la conta cellulare mediante emocitometro (camera di Neubauer). In questo modo, è possibile ottenere la concentrazione cellulare delle hiPSCs. A questo punto, si procede con la semina di differenti concentrazioni cellulari (0,5-1,5 milioni di cellule/well) in 1 ml di mTeSR1 e in una piastra costituita da 12 pozzetti, precedentemente trattata con il Matrigel. Il protocollo GiWi prevede la crescita delle cellule in 2 mL di mTeSR1 per 4 giorni (dal day -4 al day 0). In seguito, il terreno mTeSR1 è sostituito con 2 mL di RPMI 1640 e B27, una miscela di fattori di crescita priva d'insulina, e prevede l'aggiunta del CHIR99021 12 μ M. Questa molecola, agisce come un inibitore di Gsk-3 α/β , una chinasi che partecipa alla regolazione della via di segnalazione Wnt/ β -catenina [15]. Infatti, quando Wnt si lega al recettore Frizzled, quest'ultimo trasduce il segnale a varie proteine lipofile

che sono in grado di fosforilare Dishevelled, che a sua volta inibisce il complesso Gsk3/APC/Axina, che normalmente prepara la β -catenina alla degradazione ubiquitina-dipendente. Per questo motivo, la presenza di CHIR99021 nel terreno di coltura ha la funzione di attivare la β -catenina [3]. In questo caso l'attivazione del pathway innesca il differenziamento delle hiPSCs generando cellule brachyury⁺, riconducibili al fenotipo del mesendoderma (cellule che durante la gastrulazione migrano dall'epiblasto per generare l'endoderma e il mesoderma). Dopo 24 ore dall'aggiunta del CHIR99021, è necessario eliminare il terreno e aggiungere 2 mL di nuovo RPMI/B27-insulina. Dopo 3 giorni dall'incubazione del CHIR99021, si procede alla preparazione di un terreno combinato, costituito da 1 mL di terreno esausto prelevato dalla piastra e da 1 ml di terreno fresco con l'aggiunta di IWP2 5 μ M. IWP2 è un inibitore di Porcn, un'O-aciltransferasi legata alla membrana cellulare, che fisiologicamente stimola il processamento e la secrezione di Wnt. Perciò, IWP2 inibisce Wnt per indirizzare i progenitori mesendodermici verso la formazione del mesoderma cardiogeno [13].

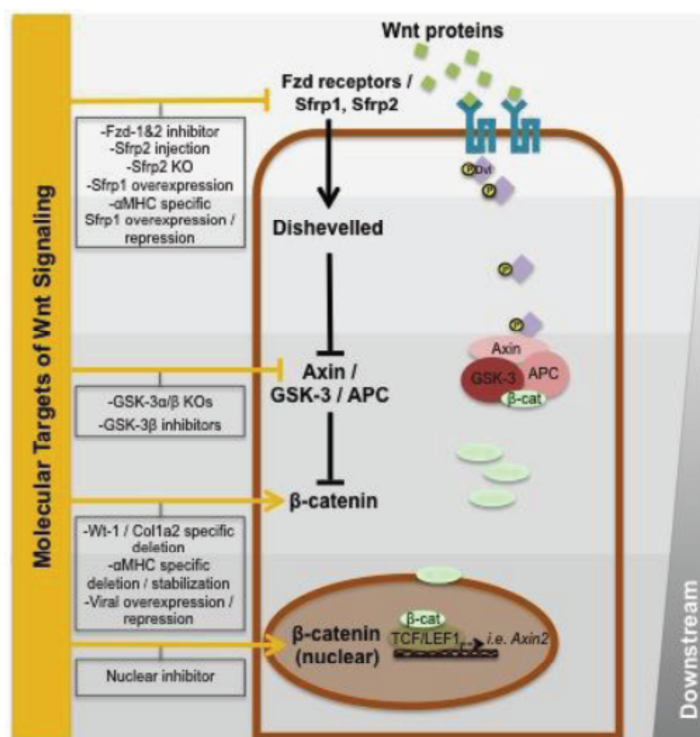


Figura 5: Effettori molecolari del pathway canonico Wnt/ β -catenina [3]

Dopo due giorni dall'incubazione con IWP2, si sostituisce il terreno con 2 mL di RPMI/B27-insulina. In seguito, le cellule sono cresciute in RPMI/B27 arricchito con insulina [13]. È stato dimostrato che il pathway di segnalazione dell'insulina influisce sullo sviluppo dei cardiomiociti *in vivo* e *in vitro* in base al momento in cui viene attivato. In particolare, nelle fasi iniziali del

differenziamento, il segnale PI3K/AKT indotto dall'insulina inibisce lo sviluppo del mesendoderma in mesoderma cardiogeno; ma successivamente l'azione dell'insulina è essenziale per il differenziamento di cellule cardiache mature [14]. A partire dal dodicesimo giorno d'induzione, si può riscontrare nella coltura la presenza di cardiomiociti organizzati nelle cosiddette *aree beating*, ovvero, zone in grado di contrarsi spontaneamente. I cardiomiociti ottenuti in questo studio mostravano poche *aree beating*. Tuttavia, dato che le cellule avevano una morfologia tipica delle cellule cardiache mature, come si può osservare nella figura 6, questo ha permesso di utilizzare i cardiomiociti Ctr ottenuti per effettuare analisi di espressione genica. Le *aree beating* raggiungono la maturità al ventunesimo giorno post-induzione. Terminata l'induzione, i cardiomiociti possono essere caratterizzati con metodi standard per valutare quantitativamente e qualitativamente l'efficienza di derivazione cardiaca.

2.1.4 CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO DELLE hiPSCs

Il congelamento e lo scongelamento delle hiPSCs viene effettuato seguendo il protocollo Jove [21]. Il congelamento delle hiPSCs prevede la preparazione di un terreno di criopreservazione definito *KnockOut SR Feeder-Free (KSR-FF)*, composto da DMEM/F12, KSOR, Glutamina (2 mM), β -mercaptoetanololo (0.1 mM) e bFGF (20 ng/ml). Il congelamento prevede l'aspirazione del terreno in cui sono mantenute le cellule e in seguito l'incubazione con 1 mL di Dispase a 37 °C per 20 minuti. La Dispase è un agente dissociante che permette di staccare la colonia integra separandola dal feeder layer. Terminata l'incubazione, la Dispase viene aspirata, e si esegue un lavaggio con 1 ml di PBS. Successivamente, le colonie sono recuperate con 1 mL di KSR-FF e trasferite in una falcon da 15 mL. Si procede poi alla centrifugazione a 200 x g per 2 minuti. In seguito, si aspira il surnatante e il pellet è risospeso con 500 μ L di un terreno definito *Freezing medium A*, costituito dal 50% di DMEM/F12 e dal 50% di KOSR. Poi, si aggiungono goccia a goccia 500 μ L del terreno *Freezing medium B*, formato dall'80% di DMEM/F12 e dal 20 % di DMSO. A quest'ultimo viene aggiunto Y-27632 10 μ M. Le hiPSCs sono poi conservate a -80 °C overnight per un giorno e successivamente in azoto liquido [21].

Un criovial contenente le hiPSCs, è scongelato a 37 °C fino a quando non rimane una piccola percentuale di ghiaccio che si scioglierà del tutto a temperatura ambiente. A questo punto, le cellule sono trasferite in una nuova falcon da 15 mL, dove saranno aggiunti goccia a goccia 4 mL di terreno KSR-FF. Si effettuerà, poi, una centrifugazione a 200 x g per 2 min. Il pellet è risospeso in 2,5 mL del terreno di mantenimento delle hiPSCs in cui è stato aggiunto Y-27632 10 μ M [21].

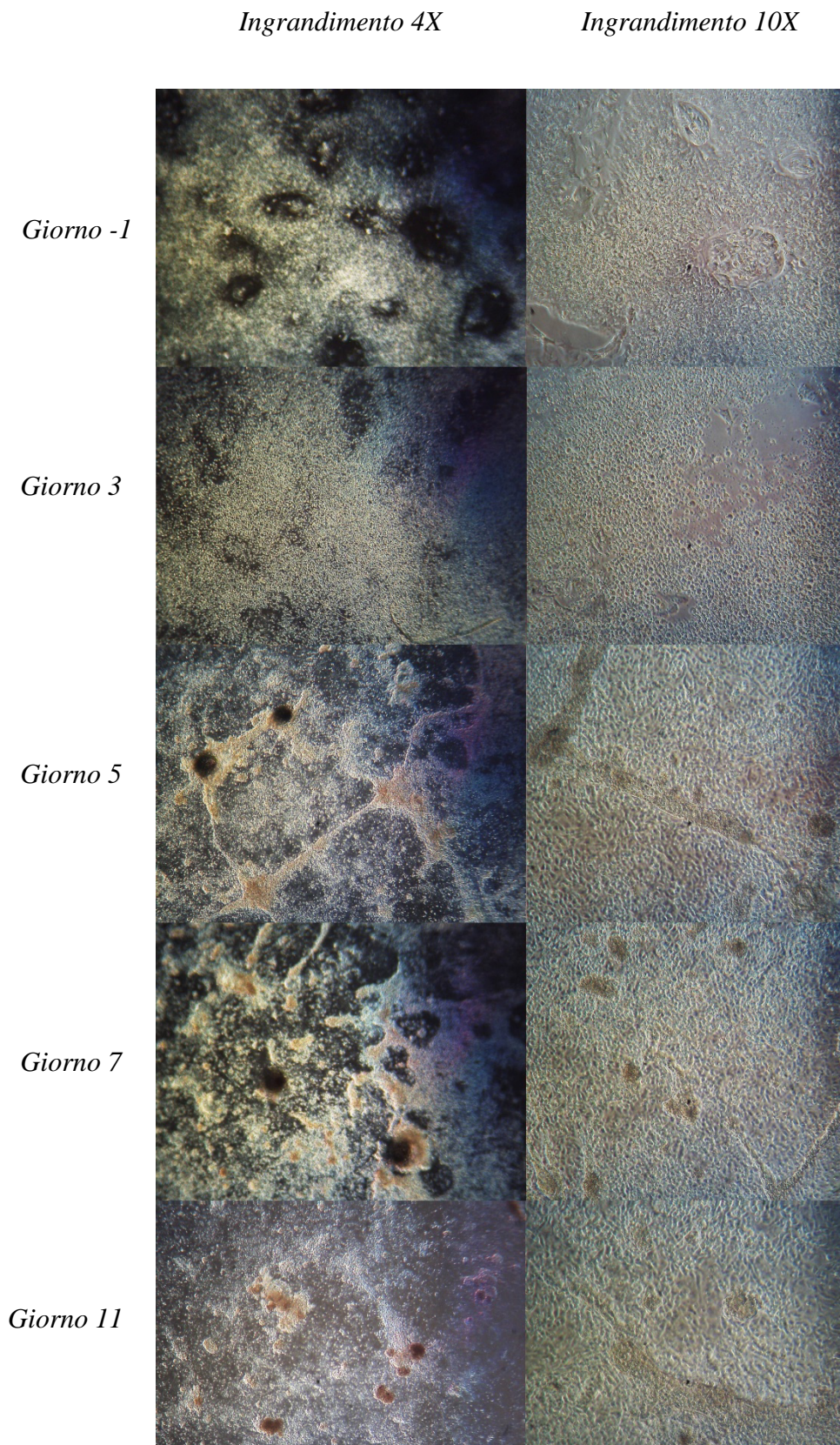


Figura 6: Morfologia dei cardiomiociti derivati da hiPSCs nei vari step del protocollo di differenziamento visualizzata mediante microscopio a contrasto di fase

2.2 Modello animale, protocollo di Ipossia Intermittente (IH) e legatura coronarica (LAD)

Il modello animale d'ipossia intermittente utilizzato per il nostro studio è costituito da topi maschi C57Bl6 di 8-10 settimane alimentati con una dieta standard fino a 24 ore prima del sacrificio; gli animali sono stabulati in box di Plexiglas a tenuta di gas e sono mantenuti a una temperatura media di 21 ± 2 °C alternando dodici ore di giorno a dodici ore di buio. Gli animali, sono stati divisi in due gruppi, il primo costituito da 40 topi cresciuti in condizioni continue di normossia, il secondo gruppo da 32 topi sottoposti a un protocollo d'ipossia intermittente. Nel gruppo dei normossici ogni box è stato insufflato con l'aria per raggiungere una pressione parziale di O_2 al 21%. I topi sottoposti a ipossia intermittente, invece, hanno subito 4 cicli d'ipossia al giorno distanziati 5 h e 35 minuti l'uno dall'altro, per un periodo totale di 14 giorni. Ogni ciclo d'ipossia è costituito da 5 fasi identiche in cui si alternano 3 minuti d'insufflazione con N_2 fino al raggiungimento della pressione parziale di O_2 al 6-8%, seguiti da 2 minuti d'insufflazione con aria per riportare la pressione al livello di normossia (Fig.1).

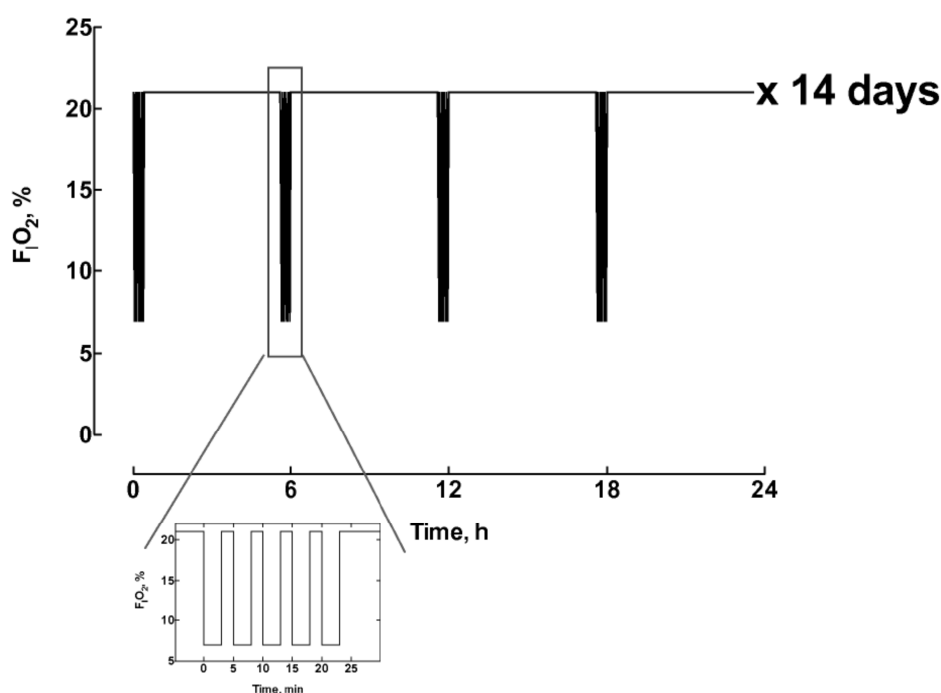


Figura 7: Schema del protocollo d'ipossia intermittente, $F_{I}O_2$ indica la frazione di O_2 nell'aria inspirata (%)

Per mimare gli effetti di un infarto miocardico, 15 topi nel gruppo dei normossici e 12 in quello degli ipossici sono stati sottoposti all'occlusione temporanea dell'arteria coronaria discendente anteriore sinistra (LAD). Dopo 30 minuti d'ischemia, il flusso è stato ristabilito grazie alla riapertura del nodo chirurgico eseguito in precedenza, generando un evento di riperfusione della durata di 3 ore. Terminata la procedura, i topi dei 4 gruppi (Normossici NO LAD, Normossici LAD, Ipossici NO LAD, Ipossici LAD) sono stati sacrificati e destinati a diverse analisi, tra cui l'analisi dell'espressione dei geni del ferro e dell'epcidina. Inoltre, in un gruppo di animali, prima del sacrificio, allo scopo di misurare l'area infartuata, è stata occlusa nuovamente l'arteria coronarica LAD e sono stati iniettati 250 µL di colorante Evans Blue 5% in grado di evidenziare l'area ischemica necrotica [16].

2.3 Analisi di espressione genica nei cardiomiociti indotti da hiPSCs e nel modello animale, mediante qRT-PCR

2.3.1 ESTRAZIONE DELL'RNA MEDIANTE TRIzol

L'RNA è stato estratto usando il TRIzol, un reagente in grado di lisare tessuti e cellule preservando l'integrità dell'RNA totale. Nel caso dei cardiomiociti indotti la lisi cellulare si ottiene aggiungendo 1 ml di TRIzol direttamente nei pozzetti della piastra. Per quanto riguarda il modello animale, invece, il tessuto cardiaco è stato pestellato con l'azoto liquido per ottenere una polvere, lisata successivamente con 1 ml di TRIzol. I campioni così lisati sono centrifugati a 12000 x g per 10 minuti a 4 °C, al fine di raccogliere nel pellet sostanze insolubili come polisaccaridi o materiali extracellulari che potrebbero interferire nell'isolamento dell'RNA. Il surnatante contiene, invece, RNA, DNA e proteine. La separazione di queste componenti viene eseguita mediante l'aggiunta di 200 µl di cloroformio al surnatante e la centrifugazione del campione a 12000 x g per 15 minuti a 4 °C. A questo punto, si riesce a distinguere una fase organica sul fondo della eppendorf contenente le proteine, una intermedia costituita da DNA e una acquosa in superficie in cui è presente l'RNA. La fase acquosa è trasferita in una nuova eppendorf, invece la fase organica è conservata a -20 °C per l'eventuale estrazione di DNA o proteine. A questo punto l'RNA è precipitato con 500 µL d'isopropanolo a -20 °C overnight. Terminata l'incubazione, si effettua una centrifugazione a 12000 x g per 10 minuti a 4°C per ottenere il pellet dell'RNA. Si procede poi al lavaggio del pellet con 1 mL di etanolo al 75%. Il campione è stato vortexato e successivamente centrifugato a 7500 x g per 5 minuti a 4 °C. Infine, dopo aver eliminato il surnatante, il pellet di RNA è asciugato all'aria per eliminare l'etanolo residuo. Infine, l'RNA viene risospeso in 40 µl di H₂O trattata con dietilpirocarbonato (DEPC), un agente alchilante che modifica i residui d'istidina necessari alla

catalisi dell'RNasi. L'RNA, così, estratto viene sottoposto ai controlli di qualità oppure conservato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2 CONTROLLO DELL'INTEGRITÀ DELL'RNA MEDIANTE CORSA ELETTROFORETICA

Durante l'estrazione, l'RNA può subire eventi di degradazione, perciò è importante verificarne l'integrità prima di utilizzarlo in qualsiasi analisi. Questo primo controllo di qualità è stato eseguito sia sui cardiomiociti indotti da hiPSCs sia sui campioni estratti dal modello animale.

A questo scopo, si usa una delle tecniche di base della biologia molecolare chiamata elettroforesi su gel di agarosio. Questa tecnica permette di separare i frammenti di acidi nucleici in base al loro peso molecolare, che è direttamente proporzionale alla loro lunghezza. In questo caso, per il controllo di qualità sull'RNA, è stato usato un gel di agarosio all'1%. L'agarosio è stato disciolto in H_2O autoclavata e in una soluzione tampone formata da Tris-acetato e EDTA (TAE 1X). In seguito, è stato aggiunto il bromuro di etidio, un agente intercalante capace di emettere fluorescenza quando eccitato con i raggi UV. Questo reagente permette di visualizzare al transilluminatore le bande corrispondenti ai frammenti migrati nel gel, che avranno un'intensità proporzionale alla quantità di acido nucleico presente nella banda.

I campioni di RNA da analizzare sono preparati mescolando $1,5\text{ }\mu\text{L}$ di RNA e $1,5\text{ }\mu\text{L}$ di *Loading Dye 2X*, costituito da formammide 95%, bromofenolo blu 0,025%, xilene cianolo 0,025%. La formammide stabilizza l'RNA e i coloranti bromofenolo blu e xilene cianolo permettono di seguire visivamente l'andamento della corsa. Inoltre, è stato preparato anche un marker grazie al quale sarà possibile avere un riferimento della lunghezza delle bande presenti nei nostri campioni. Questo marker è costituito da un mix di otto molecole di RNA a peso molecolare diverso, che prende il nome di *High Range RNA Ladder*. I campioni e il marker sono denaturati a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti per eliminare eventuali strutture secondarie dell'RNA prima di essere sottoposti a corsa elettroforetica per 1 ora a 70 Volt (voltaggio costante). Se i campioni non hanno subito la degradazione dell'RNA, allora nel gel è possibile vedere due bande distinte, corrispondenti all'RNA 18S e 28S; nel caso contrario, sarà distinguibile un'unica banda posizionata nel fondo della lane. Nel nostro caso l'RNA estratto dai campioni non risulta degradato.

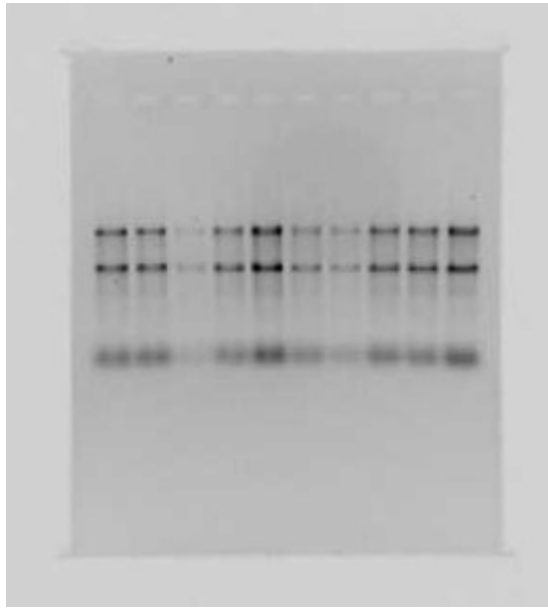


Figura 8: Gel rappresentativo per il controllo dell'integrità dell'RNA

2.3.3 VERIFICA DELLA PRESENZA DI DNA GENOMICO MEDIANTE PCR DI CONTROLLO

Nell'RNA estratto dai cardiomiociti non è stata verificata la contaminazione con il DNA genomico, a causa della scarsa quantità di RNA a nostra disposizione. L'RNA estratto dal tessuto cardiaco dei topi, è stato sottoposto al trattamento con la DNasi I e alla successiva PCR di controllo. Durante l'estrazione con il TRIZOL è possibile aver contaminato il campione di RNA con una parte di DNA genomico. Per verificare la presenza di contaminazione, è sufficiente eseguire una reazione di *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e un successivo gel di controllo. La PCR permette di amplificare per (n) cicli ogni frammento nucleotidico di cui sono note le sequenze alle estremità 5' e 3', anche se presente in minime tracce nel campione, per questo motivo è la tecnica ideale per rendere visibile la contaminazione da parte del DNA. La miscela di reazione è stata preparata in una eppendorf sterile seguendo le istruzioni del kit *Taq DNA Polymerase* (QIAGEN). In particolare, sono stati mescolati 2,5 μL di Buffer 1X, 2,5 μL di MgCl_2 , 0,5 μL di dNTPs, 0,125 μL di *primer forward* 0,1 μM , 0,125 μL di *primer reverse* 0,1 μM , 0,125 μL di *Taq Polymerase* e 18,625 μL di H_2O milliQ. I *primer* usati amplificano un tratto di un introne del gene dell'actina e sono stati scelti perché capaci di appaiarsi esclusivamente al DNA genomico e quindi in grado di rilevare efficacemente la presenza di contaminazione nell'RNA. Ai 24,5 μL della miscela di reazione sono aggiunti 0,5 μL di ogni campione; inoltre, è necessario preparare una miscela di reazione in cui vengono aggiunti 0,5 μL di DNA noto (controllo positivo) e un'altra in cui il DNA è sostituito con 0,5 μL di H_2O milliQ (controllo negativo). Il controllo positivo serve a verificare se la reazione di PCR è avvenuta in

modo corretto, mentre il controllo negativo ci permette di osservare eventuali contaminazioni di DNA presenti nelle componenti della miscela di reazione utilizzata. I controlli e i campioni, così preparati, sono sottoposti alla reazione di PCR, mediante termociclatore *Thermal Cycler (PTC-100TM)*. Tale reazione è costituita dalle seguenti fasi: fase di denaturazione iniziale e attivazione dell'enzima a 95 °C per 3', 39 cicli di amplificazione ognuno costituito da una fase di denaturazione a 95 °C per 45", una fase di *annealing* a una temperatura *primer*-specifico per 1' e una fase di estensione a 72 °C per 1'; conclusi i cicli vi è una fase di estensione finale a 72 °C per 10'. La temperatura degli amplificati viene poi portata a 4°C.

Terminata la reazione di PCR i campioni sono miscelati con un colorante chiamato *Loading Dye 6X*, composto da glicerolo 60%, bromofenolo blu 0,03% e xilene cianolo 0,03%. Grazie alla presenza del glicerolo il DNA caricato nei pozzetti del gel riesce a precipitare sul fondo, mentre i coloranti consentono di seguire la corsa. Anche in questo caso è necessario un marker di riferimento chiamato *DNA Ladder Mix* preparato grazie ad una specifica restrizione endonucleasica operata su plasmidi contenenti sequenze genomiche di pUC, pBR322, fago λ e lievito. Il marker, i controlli e i campioni sono caricati su un gel di agarosio all'1% e sottoposti a corsa elettroforetica. Al termine della corsa, è possibile visualizzare al transilluminatore l'assenza di banda nel controllo negativo, la presenza di una banda nel controllo positivo ed eventuali bande di DNA nei campioni di RNA, dimostrando la contaminazione del campione. In quel caso è necessario il trattamento con la DNasi I, mentre se non vi è contaminazione, si può procedere direttamente alla quantificazione dell'RNA.

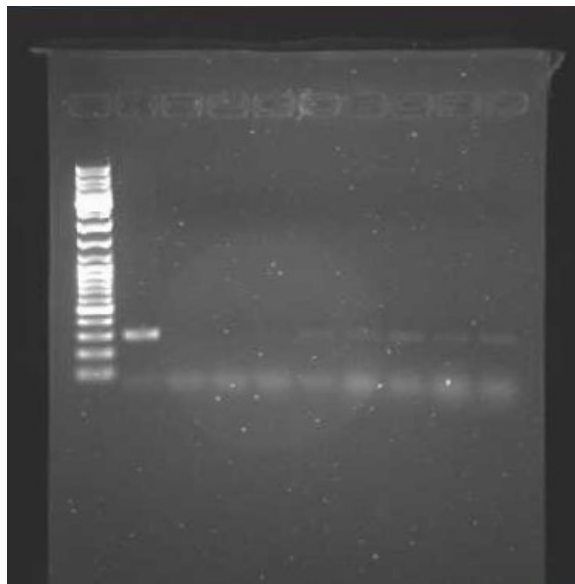


Figura 9: Gel rappresentativo per la verifica della presenza di DNA genomico (la banda visibile nei campioni, allo stesso livello del controllo positivo nel secondo pozzetto, indica contaminazione)

2.3.4 TRATTAMENTO CON LA DNasi I

La deossiribonucleasi I (DNasi I) è un enzima isolato dal pancreas bovino, in grado di digerire DNA a singolo e doppio filamento generando frammenti oligo e mononucleotidici.

Ai campioni di RNA, risospesi in 50 µL di H₂O DEPC, sono aggiunti 5 µL di *10X Reaction Buffer* e 5 µL di *Amplification Grade DNase I*; la reazione di digestione è effettuata per 15 minuti a temperatura ambiente. Trascorso il tempo d'incubazione, vengono aggiunti 5 µL di *Stop Solution* (50 mM EDTA) per bloccare la reazione, attraverso la chelazione di ioni calcio e magnesio, essenziali per l'attività catalitica dell'enzima. Per inattivare la DNasi I, 60 µL di Fenolo acido sono aggiunti alle provette che sono successivamente centrifugate a 17000 x g per 5 minuti. Al termine della centrifugazione, si ottiene una fase organica in cui si accumula anche la DNasi I e una fase acquosa, in superficie, costituita da RNA. Per eliminare le tracce del fenolo vengono effettuati tre lavaggi; infatti, alla fase acquosa, raccolta in eppendorf pulite, vengono aggiunti 60 µL di cloroformio. Le eppendorf sono centrifugate a 17000 x g per 5 minuti; viene eliminata la fase organica che contiene il cloroformio e i residui di fenolo acido, facendo attenzione a non prelevare anche la fase acquosa arricchita in RNA. L'RNA è precipitato mediante isopropanolo e si procede attraverso gli step descritti in precedenza nell'estrazione dell'RNA mediante TRIzol.

2.3.5 PCR DI CONTROLLO POST-TRATTAMENTO CON LA DNasi I

Dopo il trattamento con la DNasi I bisogna verificare se il DNA genomico, che contaminava il campione di RNA, è stato effettivamente degradato. A questo scopo, è sufficiente eseguire nuovamente la PCR con i *primer* specifici per il DNA genomico e il successivo gel di controllo, seguendo la stessa procedura effettuata per verificare la contaminazione dell'RNA estratto. In questo caso, però, ci si aspetta di trovare una banda visibile al transilluminatore esclusivamente nel controllo positivo.



Figura 10: Gel rappresentativo della PCR di controllo post-trattamento con la DNasi I (L'assenza di bande nei campioni, allo stesso livello del controllo positivo, conferma che il trattamento è andato a buon fine)

2.3.6 QUANTIFICAZIONE DELL'RNA

L'RNA estratto è quantificato mediante spettrofotometria, diluendo 2 μ L di RNA in 1 mL di H₂O milliQ. Inoltre, è importante ricordare che la lettura del bianco (1 mL di H₂O milliQ) e dei campioni viene eseguita in una cuvetta di quarzo, poiché questo materiale è adatto alla lunghezza d'onda (UV) usata nell'analisi degli acidi nucleici. La quantificazione allo spettrofotometro ci fornisce la concentrazione dell'RNA nel campione, calcolata attraverso la legge di Lambert-Beer. Inoltre, lo spettrofotometro ci fornisce il rapporto $A_{260/280}$, un valore che identifica la purezza del campione, mettendo in relazione l'assorbanza dell'RNA (A_{260}) con quella delle proteine (A_{280}). Valori di $A_{260/280}$ intorno a 2 indicano un campione qualitativamente puro.

2.3.7 REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE

La retrotrascrizione utilizza come stampo della reazione un RNA messaggero e permette di ottenere una copia complementare dello stampo, cDNA, in cui sono incluse solo le regioni codificanti del trascritto. Nella reazione è usato l'enzima retrotrascrittasi, una DNA-polimerasi RNA-dipendente e i *primer* oligo(dT)₁₈, costituiti da sequenze oligonucleotidiche di timidina, capaci di riconoscere ogni mRNA provvisto di coda poli(A).

La miscela di reazione, con un volume finale di 20 μL , è preparata seguendo le istruzioni del kit *First Strand cDNA Synthesis (RevertAidTM)*. Il primo step, prevede la preparazione di una miscela costituita da 0,1-5 μg di RNA totale, 1 μL di oligo(dT)₁₈ e H₂O DEPC per portare ad un volume di 12 μL totali. La soluzione, così preparata, è incubata a 75 °C per 5 minuti nel termociclatore *Thermal Cycler (PTC-100TM)*. In questo modo, l'RNA stampo è denaturato per eliminare le eventuali strutture secondarie ed è facilitato l'attacco dei *primer* oligo(dT)₁₈. Al termine dell'incubazione, i campioni sono conservati in ghiaccio per evitare che le strutture a forcina, tipiche dell'RNA, possano riformarsi. In seguito, sono aggiunti alla miscela di reazione 5 μL di *5X Reaction Buffer*, 2 μL di *10mM dNTP mix* e 1 μL di *20 u/ μL Ribonuclease inhibitor*. Grazie a questi elementi della miscela, la retrotrascrittasi avrà a disposizione nuovi nucleotidi trifosfato per la reazione di retrotrascrizione e lo stampo di RNA non verrà degradato dalla RNasi durante la reazione. A questo punto, la miscela è riscaldata a una temperatura prossima a quella di reazione attraverso un'incubazione a 37 °C per 5 minuti nel termociclatore. Dopo di che, è aggiunto 1 μL di *200 u/ μL M-MuLV Reverse Transcriptase*; la miscela di reazione completa è incubata a 42 °C per 60 minuti, affinché tutto l'RNA poli(A)⁺ venga retrotrascritto in cDNA. Terminata l'incubazione, la reazione è bloccata a 70 °C per 10 minuti per permettere l'inattivazione della retrotrascrittasi.

2.3.8 QUANTIFICAZIONE DEL cDNA

Per ciascun campione, la concentrazione del cDNA e il grado di purezza sono stati valutati seguendo la stessa procedura già descritta precedentemente. Dopo aver quantificato i campioni, il cDNA è stato diluito a una concentrazione di 100 ng/ μL e conservato a -20 °C per le successive reazioni di qRT-PCR.

2.3.9 DESIGN DEI PRIMER

In questo studio, sono state usate diverse coppie di *primer* per l'analisi dell'espressione dei geni regolatori dell'omeostasi del ferro (epcidina, ferritina, ferroportina, TfR1, DMT1). Le sequenze dei *primer* sono state disegnate utilizzando il software chiamato *Primer3*; inserendo la sequenza del trascritto maturo, in formato FASTA, *Primer3* restituisce una serie di coppie *primer forward* e *primer reverse* (18-25 bp) capaci di generare un amplicone di lunghezza predefinita (150-200 bp). Inoltre, *Primer3* fornisce altre informazioni essenziali, tra cui la T di melting, che non deve differire più di mezzo grado all'interno di ogni coppia di primer ottenuta e la percentuale di GC che deve essere compresa tra il 45 e 55%. In genere, il *primer left* è disegnato su un esone e il *primer right* sull'altro in modo da avere almeno un introne in mezzo. Questo permette di distinguere eventuali

amplificati a carico del DNA. Le coppie di primer identificate con *Primer3* sono validate con il software *Amplify 3X*. Tale programma effettua una PCR *in silico* e ci permette di verificare l'eventuale presenza di dimeri di *primer* e ampliconi aspecifici. Al fine di verificare che le coppie di *primer* individuate siano gene-specifiche, le sequenze dei *left primer* e dei *right primer* vengono inserite separatamente nel programma *BLASTn*, che le confronta con database di riferimento (*Human genomic + transcript, Mouse genomic +transcript*). Le sequenze dei primer utilizzate sono riportate in tabella 1 e in tabella 2.

NOME GENE	NUMERO D'IDENTIFICAZIONE DEL GENE	LEFT PRIMER	RIGHT PRIMER	LUNGHEZZA AMPLICONE
Epcidina (HAMP)	NM_021175.2	gaccagtggctctgtttcc	cacatcccacactttgatcg	430 bp
Fratassina (FXN-1)	NM_000144	tagcagaggaaacgctggac	gatttgctgtttggcgtct	170 bp
Actina B	NM_0011013	agacctgtacccaacacagt	agtactgctcagcaggagga	140 bp
GAPDH	NM_002046	cctgacctgccgtctagaaa	tgctgtagccaaattcgttg	233 bp
RNA 18S	NR_003286.2	aaacggctaccacatccaag	cctccaatggatcctcgta	155 bp

Tabella 1: coppie di primer usate per le analisi di qRT-PCR nei cardiomiociti indotti da hiPSCs

NOME GENE	NUMERO D'IDENTIFICAZIONE DEL GENE	LEFT PRIMER	RIGHT PRIMER	LUNGHEZZA AMPLICONE
Epcidina (HAMP)	NM_032541.1	catgatggcactcagcactc	caatgtctgccctgcttct	149 bp
Ferritina H (FTH1)	NM_010239	gaccgagatgatgtggctct	gtgcacactccattgcattc	187 bp
Ferroportina 1 (SLC40A1)	NM_016917.2	ccctgctctggctgtaaaag	ggtgggctctgttcacatt	160 bp
Recettore transferrina 1 (TFRC1)	NM_011638	gtattccgctcgtggagact	gagccccagaagatgtcgc	186 bp
DMT1 (SLC11A2)	NM_001146161.1	tcagagctccaccatgactg	tgtgaactgaggatgggta	235 bp
Actina B	NM_007393.3	ttgctgacaggatgcagaag	atctgctggaaggtggacag	139 bp
Hprt1	NM_013556	aaaaggacctctcgaagtgttg	ggctttgtatttgctttcc	159 bp

Tabella 2: coppie di primer usate per le analisi di qRT-PCR nel modello animale

2.3.10 qRT-PCR DEI GENI REGOLATORI DELL'OMEOSTASI DEL FERRO

La *Quantitative Real-Time PCR* (qRT-PCR) è una tecnica di biologia molecolare che permette di amplificare e quantificare simultaneamente il cDNA target. L'amplificazione avviene seguendo gli step di una classica PCR, mentre la presenza di un fluoroforo permette di quantificare la reazione di amplificazione. In questo studio, è stata usata la SYBR green, una molecola che emette fluorescenza quando s'intercala in modo aspecifico nel solco minore di tutti i dsDNA. I dati di amplificazione sono rappresentati in un grafico semilogaritmico, dove sull'asse delle x troviamo il numero di cicli e sull'asse delle y la fluorescenza emessa nel campione. Da questo grafico si ottiene il valore C_T (*Threshold Cycle*), che indica il ciclo in cui la fluorescenza, emessa durante l'amplificazione, supera un livello di background stabilito in precedenza. È importante evidenziare che il ciclo di soglia sarà inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale e di conseguenza, anche al numero di mRNA trascritti dal gene target. Per ogni gene target la quantificazione relativa del cDNA amplificato, si ottiene sottraendo dal valore C_T del campione quello ottenuto da un controllo endogeno, un gene *housekeeping* espresso costitutivamente in tutti i campioni analizzati, ricavando il termine ΔC_T . A quest'ultimo, in seguito, deve essere sottratto il ΔC_T associato al calibratore, il campione utilizzato come riferimento durante l'analisi (nel nostro caso topi Normossici NO LAD e Cardiomiociti Ctr rispettivamente). Infine, il livello di espressione genica (quantitativo) viene calcolato grazie alla formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, considerando le efficienze reali dei *primer* [15].

Prima di eseguire l'analisi di espressione genica è importante verificare che l'efficienza dei *primer* sia sufficientemente elevata per ottenere dei dati affidabili e riproducibili. L'efficienza dei *primer* si ottiene allestendo una qRT-PCR in cui vengono testate concentrazioni differenti di template iniziale, ottenute attraverso diluizioni seriali 1:2 del campione madre di cDNA. Al termine della reazione si ottiene un grafico in cui sono riportati sull'asse delle x la concentrazione del cDNA e sull'asse delle Y i cicli. Il valore di R^2 della retta deve essere prossimo a 1 e l'efficienza deve essere compresa nel range 95%-105%. La reazione di PCR viene effettuata in una piastra da 96 pozzetti e in un volume finale di 20 μ L. La miscela di reazione contiene 10 μ L di *SsoAdvanced universal SYBR Green supermix 2X*, 0,4 μ L di *forward and reverse primer* 20 μ M, cDNA a diverse concentrazioni e H₂O DEPC necessaria per portare a volume. Ogni concentrazione di cDNA è testata in duplicato ed è aggiunto anche un controllo negativo, in cui è assente il template della reazione, per verificare l'eventuale contaminazione della miscela. Terminata la preparazione degli standard e del bianco, la reazione di qRT-PCR è effettuata utilizzando il *Real-Time System (CFX96TM)* e il seguente protocollo: denaturazione iniziale del cDNA e attivazione della polimerasi

a 95 °C per 30", 40 cicli di amplificazione ognuno costituito da una fase di denaturazione a 95 °C per 15" e una fase di *annealing*/estensione a 60 °C per 30" seguita dalla lettura della fluorescenza al termine di ogni ciclo. Al termine del protocollo di amplificazione, si procede con l'analisi delle curve di melting che permette di rilevare la presenza di *primer* dimerizzati o ampliconi aspecifici. Infatti, ogni prodotto di amplificazione sarà associato a un picco con una T_m specifica che dipende dalla sua grandezza e dalla natura dei nucleotidi che lo compongono. La temperatura viene portata da 65 °C a 95 °C attraverso un incremento di 0,5 °C ogni 5". A ogni incremento di temperatura, lo strumento legge la fluorescenza e quando la temperatura raggiunge la T_m specifica dell'amplicone si assiste a un calo della fluorescenza. Tale decremento sarà rappresentato graficamente con un picco. Se il prodotto di amplificazione è unico avremo un solo picco, al contrario la presenza di più picchi indica la presenza di prodotti aspecifici. I *primer* da noi utilizzati non mostravano prodotti aspecifici e avevano un'efficienza tra 95-105%. Infine, i prodotti di amplificazione sono sottoposti a una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. In questo modo, si verifica che la lunghezza dell'amplicone corrisponda effettivamente a quella teorica indicata dal programma *Primer3*.

Valutata l'efficienza dei primer, per ogni campione è stata calcolata l'espressione di ciascun gene target o housekeeping. Nei cardiomiociti sono stati presi come controlli endogeni i geni actina, GAPDH e RNA18S, invece, nei campioni del modello animale sono stati usati actina e Hprt1. La piastra è stata allestita con i campioni in triplicato e con il controllo negativo in duplicato; inoltre, per analizzare i dati presenti in più piastre, abbiamo inserito un campione *pool*, per ogni coppia di primer, formato da una miscela di cDNA rappresentativa di tutti i campioni analizzati. La miscela di reazione è stata preparata con gli stessi componenti usati durante l'analisi di efficienza, ma in ogni pozzetto sono stati aliquotati 2 µL di cDNA 100 ng/µL per avere la stessa quantità di template iniziale. La reazione, poi, è stata effettuata utilizzando il *Real-Time System (CFX96TM)* con lo stesso protocollo descritto in precedenza. Infine, il livello di espressione genica è stato calcolato con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_T}$, utilizzando i software del *CFX Manager* e *qBase*.

3. Risultati

3.1 Cardiomiociti derivati da hiPSCs

L'analisi di espressione della fratassina, è stata effettuata nei cardiomiociti FRDA e Ctr. I risultati ottenuti hanno evidenziato un calo significativo dell'espressione della fratassina nei cardiomiociti FRDA rispetto ai controlli, confermando in questo modo il fenotipo patologico associato al deficit di questa proteina. È stata poi valutata l'espressione del gene HAMP nei cardiomiociti ottenuti da diversi esperimenti di derivazione cardiaca. Come si può osservare nel grafico (figura 12) i cardiomiociti FRDA mostrano un aumento significativo dell'espressione genica dell'epcidina, rispetto ai controlli.

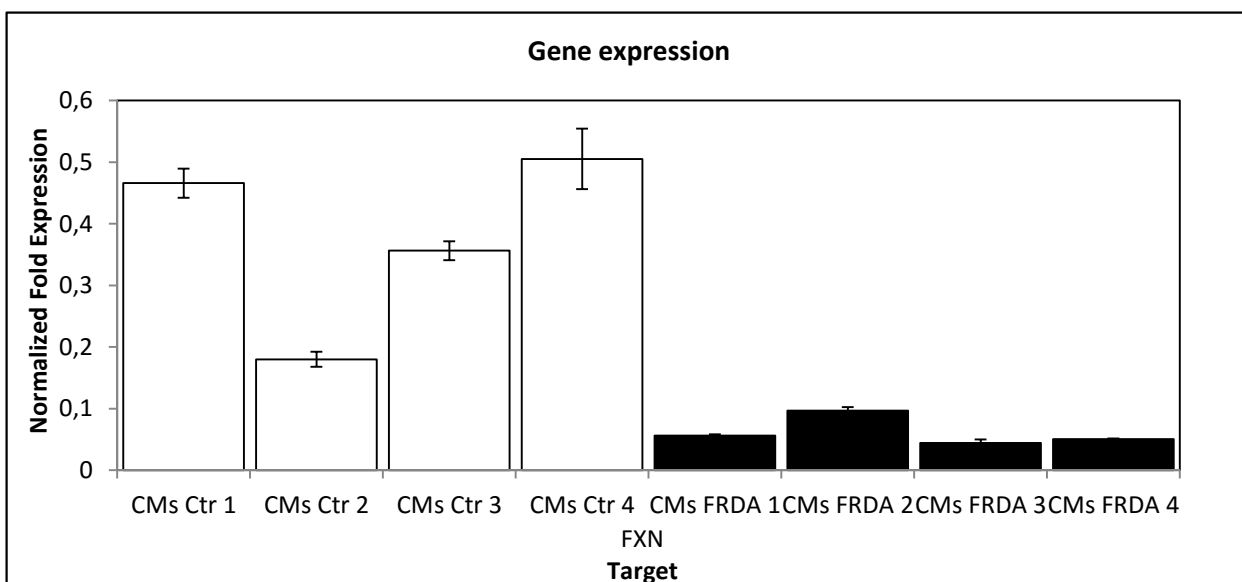


Figura 11: Espressione del gene FXN codificante la fratassina nei cardiomiociti derivati da hiPSCs

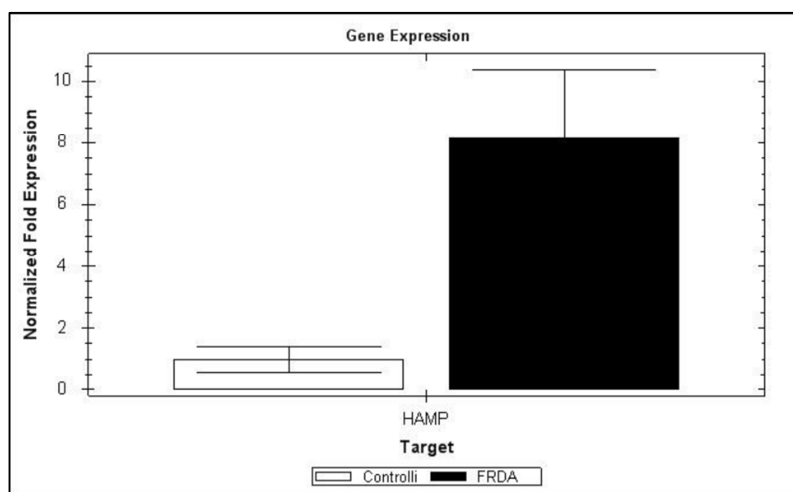


Figura 12: Espressione del gene HAMP codificante l'epcidina nei cardiomiociti derivati da hiPSCs

3.2 Modello murino sottoposto a ipossia intermittente (IH) e legatura coronarica (LAD)

L'analisi di espressione del gene HAMP è stata valutata nei quattro gruppi di topi, Normo NO LAD, IH NO LAD, Normo LAD, IH LAD, ognuno dei quali è costituito da cinque animali. Come riportato in Figura 14, l'ipossia intermittente (IH) non altera l'espressione di HAMP, che risulta essere significativamente aumentata nei topi Normo LAD; tale aumento, però, è attenuato nei topi IH LAD.

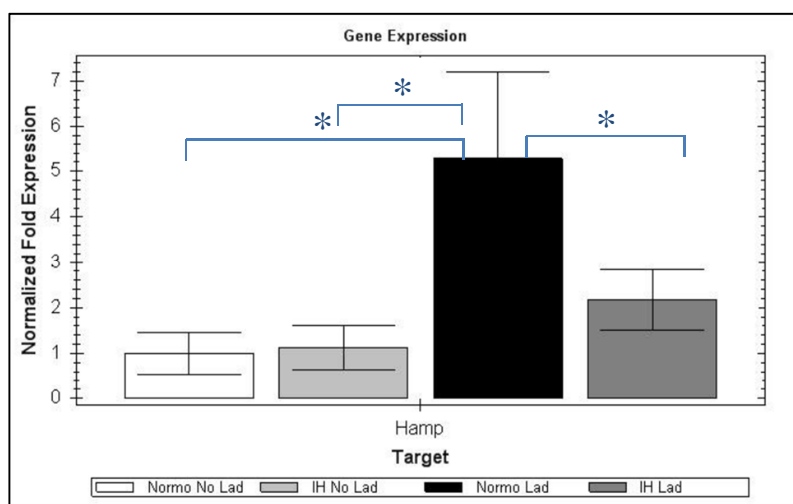


Figura 14: Espressione del gene HAMP codificante l'epcidina

È stata poi effettuata l'analisi di espressione del gene FTH1, codificante per la ferritina H, una delle due subunità della proteina coinvolta nello *storage* del ferro citosolico. L'espressione del gene FTH1 aumenta significativamente nei topi sottoposti a IH con o senza LAD, mentre il danno da ischemia-riperfusion non altera l'espressione di questo gene.

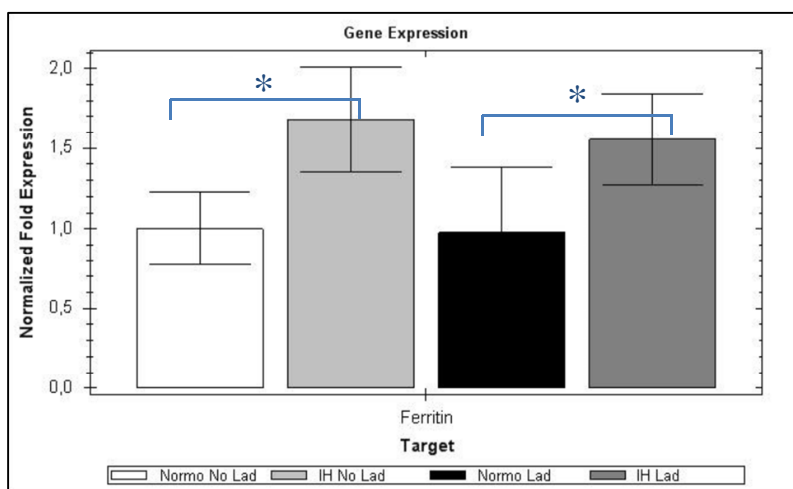


Figura 15: Espressione del gene FTH1 codificante la ferritina H

Infine, è stata studiata l'espressione dei geni SLC40A1, SLC11A2 e TFRC1, i quali codificano rispettivamente per la ferroportina 1, per il trasportatore di ioni metallici divalenti 1 (DMT1) e per il recettore della transferrina 1 (TfR1). L'espressione di questi tre geni tende ad aumentare in presenza di ipossia intermittente (IH NO LAD) rispetto al controllo (Normo NO LAD). Inoltre, nei topi Normo LAD e IH LAD, l'espressione di TfR1 diminuisce in modo significativo rispetto ai normossici e agli ipossici senza LAD. Lo stesso andamento si riscontra nell'espressione della ferroportina 1, invece, l'espressione genica di DMT1 risulta invariata e non evidenzia differenze significative fra i vari gruppi studiati.

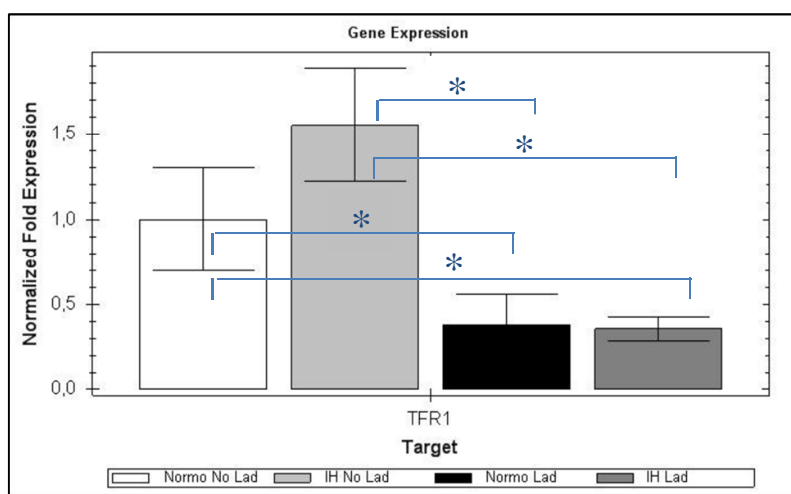


Figura 16: Espressione del gene *TFRC1* codificante il recettore della transferrina 1 (*TfR1*)

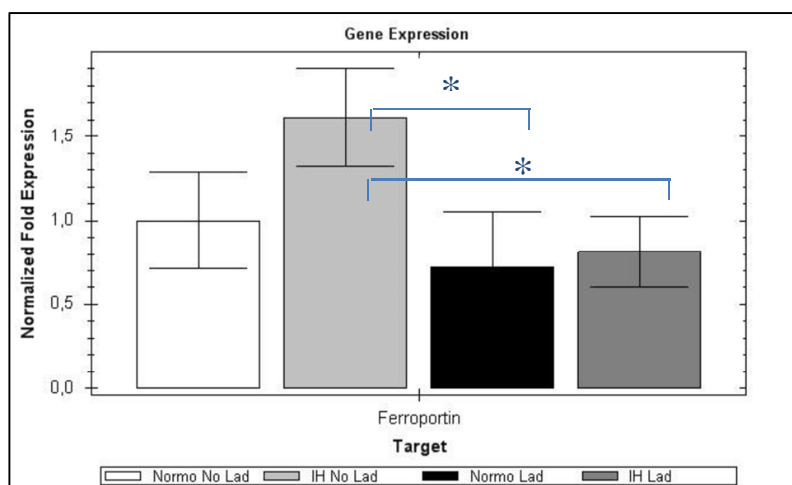


Figura 17: Espressione del gene *SLC40A1* codificante la ferroportina 1

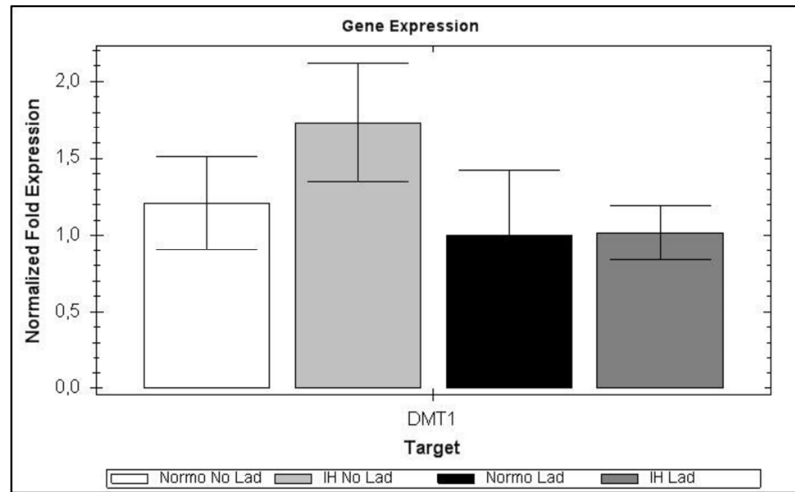


Figura 18: Espressione del gene *SLC11A2* codificante *DMT1*

4. Discussione

È stato dimostrato che il ferro ha un ruolo chiave in alcune malattie cardiache incluse le cardiomiopatie da sovraccarico di ferro e il danno da ischemia-riperfusion. L'epcidina (HAMP) è un ormone peptidico coinvolto nella regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro e risulta essere espresso anche a livello cardiaco, ma il suo ruolo in tale organo rimane da chiarire. Nel laboratorio della prof.ssa Marini si studia da alcuni anni l'atassia di Friedreich (FRDA), una patologia neurodegenerativa associata a cardiomiopatia da accumulo di ferro. Una delle grandi difficoltà nello studio di questa patologia è la mancanza di modelli animali e cellulari adeguati. L'avvento della tecnologia delle iPSCs messa a punto da Yamanaka risulta essere un valido strumento per lo studio di queste patologie. Infatti, il gruppo di ricerca della Prof.ssa Marini, al fine di studiare l'espressione genica dell'epcidina e delle proteine regolatrici dell'omeostasi del ferro, ha derivato cardiomiociti a partire da hiPSCs di un soggetto affetto da FRDA e da hiPSCs di un soggetto sano scelto come controllo (FRDA e Ctr). I primi dati ottenuti avevano evidenziato un aumento dell'espressione del gene HAMP nei cardiomiociti FRDA, rispetto ai controlli. In questo studio abbiamo validato il dato dell'espressione del gene HAMP precedentemente ottenuto, in diversi esperimenti di derivazione cardiaca. I risultati ottenuti confermano l'aumento di espressione del gene HAMP nei cardiomiociti FRDA. Uno studio condotto da Hsieh e collaboratori (2014) ha dimostrato che il silenziamento di HAMP tramite siRNA in cardiomiociti umani sottoposti a sovraccarico di ferro, induce apoptosi. Questo dimostra che HAMP è implicata nella sopravvivenza delle cellule cardiache [9]. Quindi, l'aumento dell'epcidina riscontrato nei cardiomiociti FRDA potrebbe avere un effetto cardioprotettivo. In un altro studio condotto da Levi e collaboratori (2015), è stata evidenziata la presenza di cellule infiammatorie doppiamente positive a CD68+, un marker espresso dai monociti, e all'epcidina in biopsie cardiache di pazienti affetti da FRDA. Gli autori ipotizzano che la presenza di epcidina potrebbe essere responsabile dell'accumulo di ferro alterando il meccanismo di esportazione del ferro dai macrofagi. Questo potrebbe contribuire al danno cardiaco caratteristico dei soggetti affetti da FRDA [10]. I nostri dati dimostrano per la prima volta che l'espressione genica dell'epcidina è aumentata nei cardiomiociti indipendentemente dalla presenza di cellule infiammatorie. Rimane ancora da chiarire se il ruolo dell'epcidina nei disturbi cardiaci abbia un ruolo cardioprotettivo oppure la sua espressione sia regolata da meccanismi indotti dal danno cardiaco.

A tale scopo, abbiamo pensato di analizzare l'espressione genica di HAMP e di altri geni regolatori del ferro in un modello murino sottoposto a ipossia intermittente (IH) e/o a un danno cardiaco

(legatura coronarica, LAD). I risultati ottenuti in uno studio pubblicato da Marini *et al.* (2013) avevano dimostrato che, a parità di area a rischio, l'ipossia intermittente (IH) ha un effetto cardioprotettivo in termini di riduzione dell'area infartuata nei cuori dei topi sottoposti alla legatura coronarica (LAD). Inoltre, l'ipossia intermittente era in grado di migliorare la contrattilità del miocardio e favorire il processo di neoangiogenesi [16].

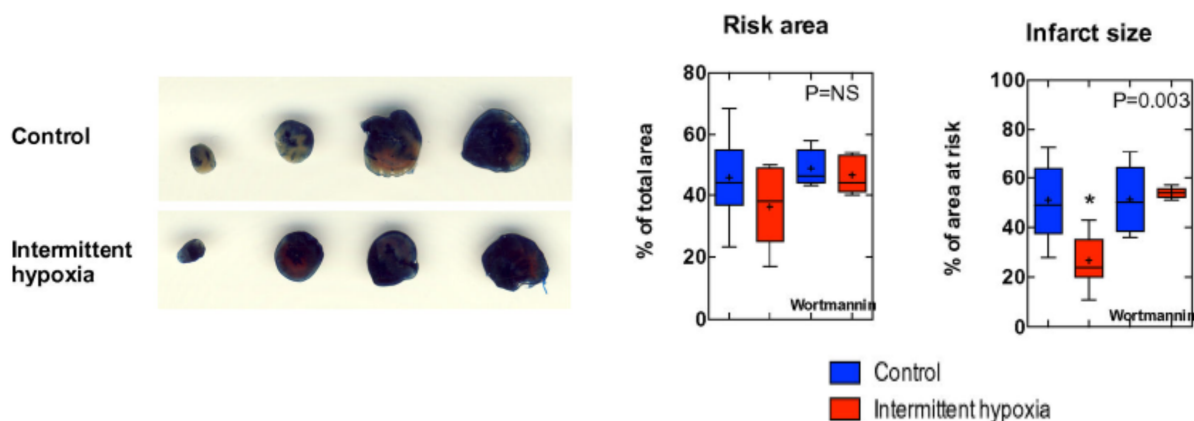


Figura 13 (sinistra): le aree blu e bianche rappresentano rispettivamente il tessuto sano e necrotico, mentre le aree rosse e bianche indicano il tessuto a rischio [16]. Figura 13 (destra): box-plot che evidenzia la riduzione significativa dell'area infartuata nei topi sottoposti a ipossia intermittente [16]

I dati ottenuti in questo studio hanno evidenziato che, in presenza di uno stimolo cardioprotettivo quale l'ipossia intermittente, l'epcidina non subisce alterazioni della sua espressione genica. Invece, in presenza di un danno, ovvero la legatura coronarica, è stato evidenziato un aumento significativo dell'espressione genica di HAMP che resta simile ai valori dei controlli nei topi sottoposti a ipossia intermittente. L'aumento di espressione del gene HAMP nei topi normossici sottoposti a un danno quale la legatura coronarica (Normo LAD) è in linea con quanto trovato nei cardiomiociti FRDA, suggerendo che questo gene potrebbe essere indotto in presenza di un danno cardiaco.

È noto che la ferritina (FTH1) è un'importante proteina coinvolta nello *storage* del ferro e svolge un ruolo antiossidante nelle cellule, in quanto complessa il ferro e lo rende indisponibile alle reazioni di Fenton. Pertanto, il suo aumento evidenziato nei topi IH sia in assenza che in presenza di un danno, potrebbe contribuire alla cardioprotezione indotta da ipossia intermittente. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Bulvik e collaboratori (2012) in esperimenti condotti su ratti sottoposti a brevi periodi d'ischemia e/o ischemia-riperfusion. In questo studio è stato evidenziato che l'ipossia potrebbe innescare il "segnale del ferro" nelle cellule cardiache, ovvero, la liberazione di piccole

quantità di ferro attraverso la degradazione della ferritina citosolica, necessarie per indurre la sintesi di nuova apoferritina [4]. In questo modo, grazie all'ipossia la cellula accumulerebbe grandi quantità di mRNA codificante per la ferritina, che verrebbero tradotti durante il danno da ischemia-riperfusion per sequestrare il ferro citosolico liberato nell'ischemia prolungata, al fine di ridurre la produzione di ROS. Tuttavia, l'espressione del gene FTH1 rimane invariata in presenza di un danno come la LAD e questo risultato è in linea con quanto evidenziato nei cardiomiociti FRDA.

Per quanto riguarda le proteine coinvolte nell'importazione e nell'esportazione del ferro è stato individuato lo stesso andamento di espressione genica. Infatti, nei topi sottoposti a IH senza la legatura coronarica, i geni codificanti per TfR1, DMT1 e ferroportina 1 tendono ad aumentare la loro espressione, come se la mancanza di ossigeno per brevi periodi fosse in grado di favorire il passaggio del ferro all'interno delle cellule cardiache. Al contrario, l'espressione di questi tre geni è diminuita nei topi sottoposti a legatura coronarica (LAD), probabilmente perché la carenza di ossigeno per un periodo prolungato come l'ischemia indotta dalla LAD è in grado di inibire i meccanismi alla base del trasporto cellulare del ferro. Il calo di TfR1 e ferroportina 1 nei topi sottoposti alla legatura coronarica ha un pattern di espressione simile a quello evidenziato nei cardiomiociti FRDA ottenuti da esperimenti precedentemente condotti nel nostro laboratorio.

Concludendo, i risultati di espressione genica dell'epcidina e dei geni regolatori del ferro ottenuti in questo studio saranno validati mediante studi di espressione proteica come il Western Blot o il Kit ELISA. Inoltre, ci proponiamo di studiare il ruolo delle proteine regolatrici del ferro (IRP1/2), in quanto importanti nella regolazione post-trascrizionale dell'omeostasi del ferro e la ferritina mitocondriale, una proteina che partecipa alla regolazione della distribuzione del ferro tra citosol e mitocondrio [7].

5. Bibliografia

- [1] J.P. Greer *et al.*: **Wintrobe's Clinical Hematology**. Thirteenth edition. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 617-624, 2013.
- [2] M. Amano, M. Nakayama, and K. Kaibuchi, "**Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity**" *Cytoskeleton*, vol. 67, no. 9, pp. 545–554, 2010.
- [3] J. Buikema, P.-P. Zwetsloot, P. Doevendans, I. Domian, and J. Sluijter, "**Wnt/ β -Catenin Signaling during Cardiac Development and Repair**" *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, vol. 1, pp. 98–110, 2014.
- [4] B. E. Bulvik, E. Berenshtein, E. G. Meyron-Holtz, A. M. Konijn, and M. Chevion, "**Cardiac Protection by Preconditioning Is Generated via an Iron-Signal Created by Proteasomal Degradation of Iron Proteins**" *PLoS One*, vol. 7, no. 11, 2012.
- [5] E. Gammella, S. Recalcati, I. Rybinska, P. Buratti, and G. Cairo, "**Iron-induced damage in cardiomyopathy: oxidative-dependent and independent mechanisms**" *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, p. 230182, 2015.
- [6] T. Ganz, "**Hepcidin and iron regulation, 10 years later**" *Blood*, vol. 117, no. 17, pp. 4425–4433, Apr. 2011.
- [7] G. Gao and Y.-Z. Chang, "**Mitochondrial ferritin in the regulation of brain iron homeostasis and neurodegenerative diseases**" *Front. Pharmacol.*, vol. 5, no. February, p. 19, 2014.
- [8] P. González-Cabo and F. Palau, "**Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia**" *J. Neurochem.*, vol. 126, no. SUPPL.1, pp. 53–64, 2013.
- [9] Y.-P. Hsieh, C.-H. Huang, C.-Y. Lee, C.-Y. Lin, and C.-C. Chang, "**Silencing of hepcidin enforces the apoptosis in iron-induced human cardiomyocytes**" *J. Occup. Med. Toxicol.*, vol. 9, no. 1, p. 11, 2014.
- [10] A. H. Koeppen, R. L. Ramirez, A. B. Becker, S. T. Bjork, S. Levi, P. Santambrogio, P. J. Parsons, P. C. Kruger, K. X. Yang, P. J. Feustel, and J. E. Mazurkiewicz, "**The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia**" *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–16, 2015.
- [11] Y. K. Lee, P. W. L. Ho, R. Schick, Y. M. Lau, W. H. Lai, T. Zhou, Y. Li, K. M. Ng, S. L. Ho, M. A. Esteban, O. Binah, H. F. Tse, and C. W. Siu, "**Modeling of Friedreich ataxia-related iron overloading cardiomyopathy using patient-specific-induced pluripotent stem cells**" *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 466, no. 9, pp. 1831–1844, 2014.
- [12] X. Li, R. Krawetz, S. Liu, G. Meng, and D. E. Rancourt, "**ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells**" *Hum. Reprod.*, vol. 24, no. 3, pp. 580–589, 2009.

- [13] X. Lian, J. Zhang, S. Azarin, K. Zhu, L. B. Hazeltine, X. Bao, C. Hsiao, T. Kamp, and S. P. Palecek, “**Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions**” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 1, pp. 162–175, 2013.
- [14] X. Lian, J. Zhang, K. Zhu, T. J. Kamp, and S. P. Palecek, “**Insulin inhibits cardiac mesoderm, not mesendoderm, formation during cardiac differentiation of human pluripotent stem cells and modulation of canonical wnt signaling can rescue this inhibition**” *Stem Cells*, vol. 31, no. 3, pp. 447–457, 2013.
- [15] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “**Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method**” *Methods*, vol. 25, pp. 402–408, 2001.
- [16] G. Milano, P. M. Abruzzo, A. Bolotta, M. Marini, L. Terraneo, B. Ravara, L. Gorza, M. Vitadello, S. Burattini, D. Curzi, E. Falcieri, L. K. von Segesser, and M. Samaja, “**Impact of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway on the Cardioprotection Induced by Intermittent Hypoxia**” *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–14, 2013.
- [17] D. Marmolino, “**Friedreich’s ataxia: Past, present and future**” *Brain Res. Rev.*, vol. 67, no. 1–2, pp. 311–330, 2011.
- [18] U. Merle, E. Fein, S. G. Gehrke, W. Stremmel, and H. Kulaksiz, “**The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation**” *Endocrinology*, vol. 148, no. 6, pp. 2663–2668, 2007.
- [19] C. H. Park, E. V. Valore, A. J. Waring, and T. Ganz, “**Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver**” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 7806–7810, 2001.
- [20] R. Santos, S. Lefevre, D. Sliwa, A. Seguin, J.-M. Camadro, and E. Lesuisse, “**Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities**” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 13, no. 5, pp. 651–90, 2010.
- [21] K. Wagner and D. Welch, “**Cryopreserving and recovering of human iPS cells using complete Knockout Serum Replacement feeder-free medium**” *J. Vis. Exp.*, vol. 76, no. 41, pp. 10–13, 2010.
- [22] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, and Y. Sasai, “**A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells**” *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 6, pp. 681–6, 2007.