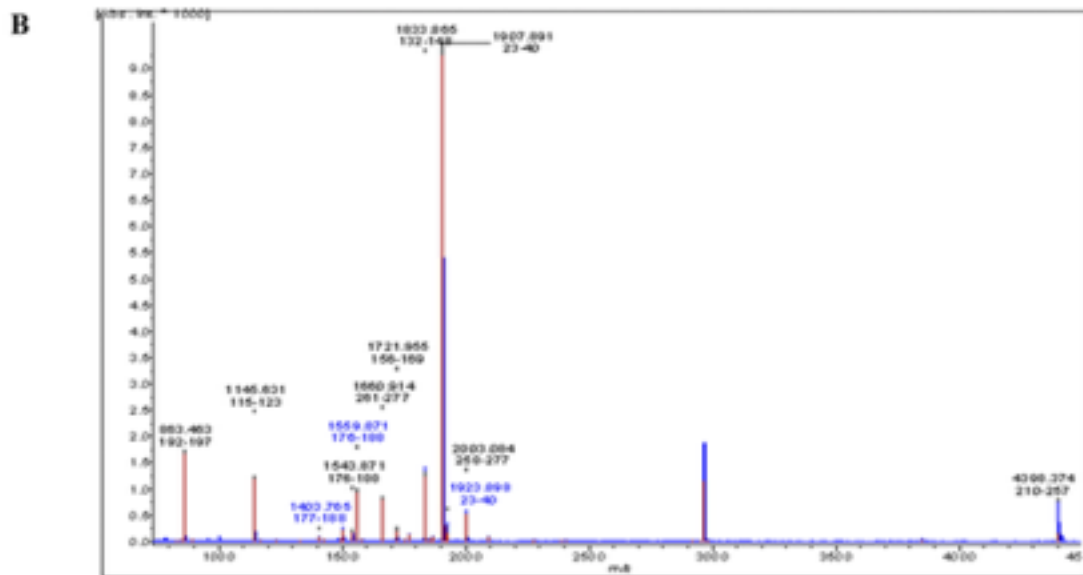
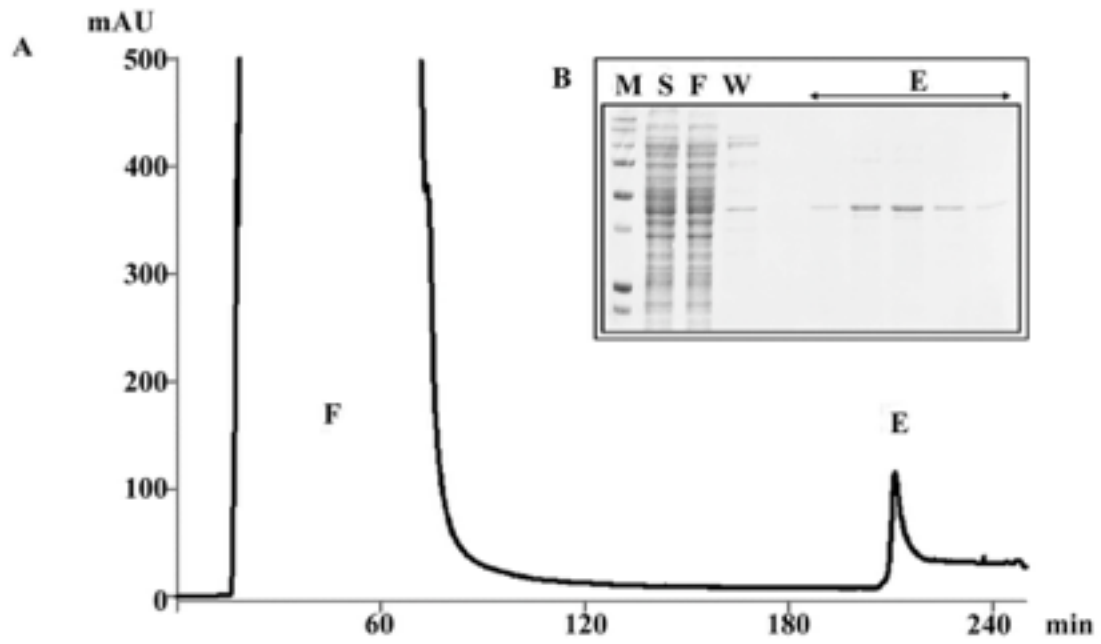


Differenziazione in cellule beta-pancreatiche da parte di cellule staminali di albero biliare di uomo adulto, tramite trattamento con peptide Pdx1 ricombinanti

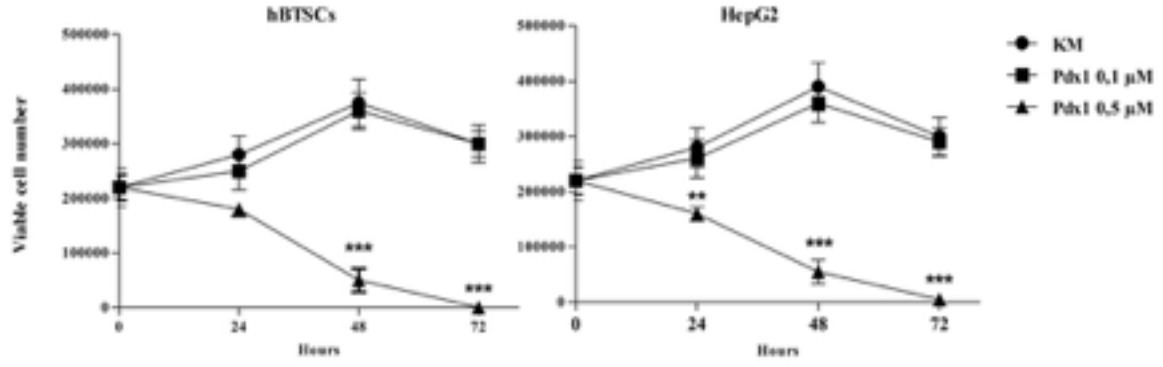
ABSTRACT

La generazione di cellule beta-pancreatiche rappresenta un obiettivo importante nel campo della ricerca. Lo scopo di questo studio è stato quello di esplorare una strategia a base di proteine al fine di indurre la differenziazione delle cellule umane staminali biliari (human biliary tree stem cells - hBTSCs) verso le cellule beta-pancreatiche. È stato sintetizzato in *E. coli* un plasmide contenente la sequenza del pancreas umano e di cellule duodenali homeobox 1 (PDX1). Sono state coltivate in vitro le cellule epiteliali di adesione alla molecola hBTSCs (Epiteliali-Cell-Adhesion Molecule-hBTSCs) positivi o epatiti di cellule umane mature, HepG2, e, in questa coltura, è stato aggiunto il peptide Pdx1. Le differenziazioni delle cellule epiteliali verso cellule pancreatiche sono stati valutati mediante l'espressione dei fattori di trascrizione β -cellule, Pdx1 e musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene omologo A e degli ormoni pancreatici, l'insulina, glucagone e somatostatina, mentre i metodi di indagini usati sono stati il Real time PCR, Western Blot, microscopia ottica ed immunofluorescenza. È stato inoltre misurato anche la secrezione di peptide-C in relazione ad un alto livello di glucosio. I risultati hanno indicato come il Pdx1 purificato corrisponde alla struttura primaria della Pdx1 umano mediante spettroscopia di massa è stato prodotto in modo efficiente in batteri e trasdotto in hBTSCs. L'esposizione del Pdx1 ha attivato l'espressione di entrambi gli stadi delle β -cellule, mature e intermedie, solo in hBTSCs ma non nella linea cellulare HepG2. Inoltre, hBTSCs esposti a Pdx1 hanno mostrato una regolazione dei geni di insulina, glucagone e somatostatina e la formazione di strutture insulari, tridimensionali, intensamente positive per insulina e glucagone. Infine, le strutture insulari indotte dal Pdx1 ed esposta a una somministrazione regolata di glucosio, generano una secrezione di pep-

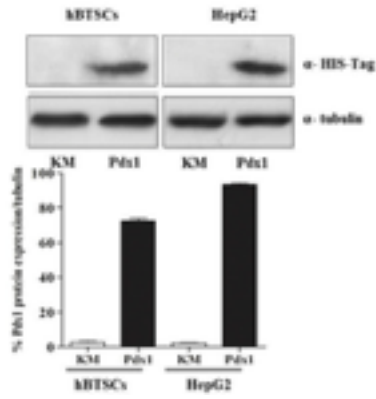
ptide-c regolato. In conclusione, il Pdx1 umana è altamente efficace nel provocare la differenziazione hBTSC verso le cellule beta del pancreas-funzionali.



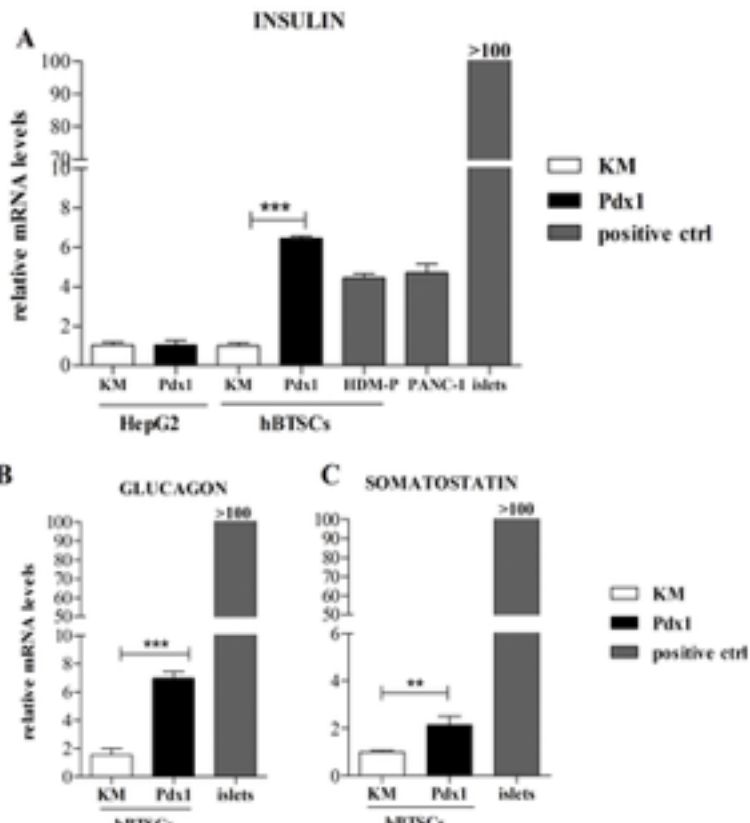
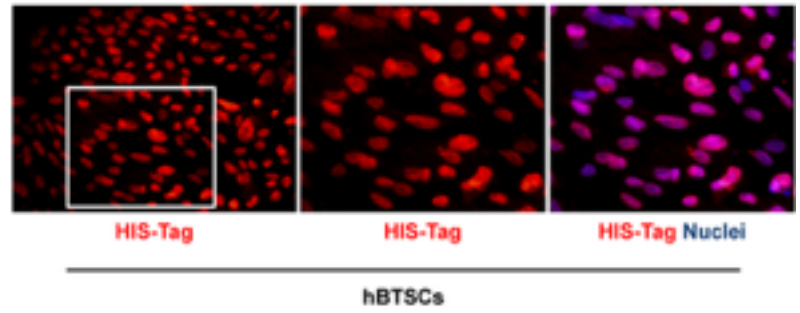
A



B



C



Introduzione

Negli ultimi anni, sono stati proposti diversi tentativi di riprogrammare cellule del fegato in cellule endocrine pancreatiche [1-3]. Pdx1 o trasduzione di proteine Pdx1-VP16, ad esempio, induce l'espressione genica β -cellule nella linea di cellule epatiche di ratto (WB-F344) con caratteristiche simili alle cellule staminali [1]. Topo adulto colangiociti intraepatici sono state indotte in vitro per diventare cellule che producono insulina per trasfezione con adenovirale (Ad) -Pdx1 che induce non solo insulina, ma anche Glut2 e Prohormone convertasi 1 e 2 espressione [2]. Anche popolazioni di cellule primarie di cuneo di fegato ottenute tramite resezione chirurgica dei suini Yorkshire, elettroporate con un plasmide di espressione di insulina, dimostrano una differenziazione pancreatica funzionale [3]. Tuttavia, la discendenza delle cellule con diverso grado di maturazione epatica mostrano grandi differenze nella capacità di conseguire una differenziazione pancreatica endocrina. Infatti, la trasfezione virale di un singolo fattore di trascrizione Ngn3, inducono un cambio della discendenza delle cellule da uno stato epatico ad uno stato di isole solo nelle cellule progenitrici ma non negli epatociti terminalmente differenziate [4]. Inoltre, in un recente studio di Banga et al. [5] è stata definita una strategia per guidare le cellule del fegato verso la differenziazione in cellule endocrine del pancreas attraverso la riprogrammazione genetica di espressione Pdx1, ed è culminato nella espressione di marcatori isole pancreatiche specificamente all'interno di ghiandole di elementi positivi SOX9 dei dotti biliari. Abbiamo recentemente identificato una popolazione di cellule staminali / progenitrici eterogeneo all'interno delle ghiandole peribiliari

(PBG) dell'albero biliare umano [6-11]. Queste cellule, denominate cellule umani biliare albero staminali / progenitrici cellule (hBTSCs), esprimono un ampio pannello di marcatori di cellule staminali endoderme che, esposte in vitro a lungo termine di persistenza e di auto-rinnovamento, sono in grado di dare origine a una progenie di cellule mature differenti (epatociti, colangiociti e cellule beta-pancreatiche) [6-11]. Persistono però un certo numero di limitazioni e svantaggi inerenti alla metodologia retrovirale e di riprogrammazione di serie (alterazioni genetiche permanenti) [12]. Pertanto, abbiamo cercato di indurre la differenziazione delle hBTSCs di cellule che producono insulina funzionali tramite una strategia innovativa a base di proteine.

Materiali e metodi

produzione Pdx1

il Pdx1 ricombinante è stato ottenuto sotto forma di una proteina di fusione collegando 6His-tag al N-terminale della sequenza di amminoacidi. La lunghezza completa della sequenza di DNA codificante per PDX1 umano (852 bp codifica per 283 aa) adatto per l'espressione eterologa in *E. coli* è stata fornita da GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ). La sequenza è stata amplificata mediante PCR utilizzando un primer 5'-TATCATATGAACGGTGAAGAACAGTACTAC-3' e 5'-ATACTCGAGCTAACGTGGTTCTTGCGGACGGC-3'. Dopo lo smaltimento con NdeI e BamHI, l'amplicone è stato ligato in un vettore d'espressione pET-28a (Novagen-Merck, Darmstadt, Germania), ottenendo un plasmate pET-PDX1. Questo costrutto è stato utilizzato per trasformare la BL21 (DE3) del ceppo di *E. coli* (Invitrogen, Italia).

purificazione del Pdx1

L'estratto cellulare è stato caricato in una colonna di 10 ml di Ni²⁺ + -activated chelante Sepharose FF (GE Healthcare, Italia). Le frazioni contenenti proteine Pdx1 sono state analizzate mediante SDS-PAGE. Una colonna Sephadex G-25 (GE Healthcare, Italia) è stata impiegata per rimuovere imidazolo e scambiare un tampone con PBS. Le analisi tramite la spettrometria di massa sono state effettuate dopo la digestione tritico della banda di 43 kDa isolate da Coomassie blu gel colorato. Gli spettri di massa sono stati acquisiti tramite lo strumento Ultraflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker-Daltonics, Brema, Germania), e siti di peptidi sono stati cercati nel database NCBI dal motore di ricerca MASCOT.

Isolamento di hBTSC da un albero biliare extraepatico umano

tessutoi biliari umani adulti normale sono stati raccolti da fegati intatti e pancreas ottenute da donatori di organi presso l'Università di Roma la Sapienza, Roma, Italia. Abbiamo ricevuto l'albero biliare da donatori di organi, poiché la maggior parte delle vie biliari, che comprende dotto biliare, dotto cistico, cistifellea e comuni ampolla epato-pancreatiche, è ordinariamente rimosso durante le procedure di trapianto di fegato. Il protocollo di ricerca è stato esaminato e approvato il 17 giugno 2010 (protocollo 541/10) da parte del Comitato Etico del Policlinico Umberto I di Roma (nome completo della scheda / comitato), e il trattamento risulta essere conforme alle Good Manufacturing Practice (Pratiche di Buna Manifatturazione). E' stato ottenuto Il consenso informato scritto dal parente più prossimo per l'utilizzo del campione di questo studio di ricerca. I campioni di tessuto sono stati digeriti in RPMI 1640 addizionato con 0,1% di albumina di siero bovi-

no, 1nM selenio, antibiotici, collagenasi tipo I (300 collagene digestione unità / ml), 0,3 mg / ml deossiribonucleasi, posti 37 ° C se otto agitazione per 30-45 min . Le sospensioni sono state filtrate attraverso un filtro a 500 micron a maglia metallica (IDEALE ACLRI9 acciaio inox) e centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti per ottenere una prima risospensione delle cellule. Da allora in poi, le sospensioni cellulari sono state passate consecutivamente attraverso un filtro a rete 100 e 30 micron; In seguito, il conteggio delle cellule è stata effettuato da 102 Fast-Read (Biosigma Srl, Venezia, Italia) e la vitalità cellulare (espressa in% sulle cellule totali) è stata valutata tramite il test di esclusione Trypan Blue. La vitalità cellulare risulta essere costantemente superiore al 95%. cellule biliari extraepatiche isolate sono state ordinate per la EpCAM + utilizzando microsferi EpCAM (Miltenyi Biotec Inc., catalogo # 130-061-101Germany) come indicato dal produttore. Poi, la sospensione cellulare è stata caricata su una colonna MACS LS (Miltenyi Biotec Inc., catalogo # 130-042-401) che è stata inserita nel campo magnetico di un separatore MACS. Le cellule EpCAM + magneticamente etichettate sono state mantenute all'interno della colonna, mentre le cellule non marcate sono state fatte passare attraverso la colonna. Dopo aver rimosso la colonna dal campo magnetico, le cellule EpCAM + magneticamente conservate sono state eluite come celle selezionate positivamente. Come descritto precedentemente Le cellule EpCAM + se la vitalità delle cellule sono state valutate dal numero delle cellule totali.

cellule di controllo

le cellule delle isole pancreatiche normali sono state acquistate da ProdoLab, Irvine CA USA (HIR-001), mentre una linea di cellule beta del pancreas umano (PANC-1 linea di

cellule ibride 1.1B4) è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich (cat. N.100128101), e sono stati utilizzati come controlli positivi.

cellule HepG2, sono state acquistate commercialmente da ATCC No. HB-8065, e rappresentano un adeguato modello in vitro per lo studio di epatociti umani polarizzati; cellule HepG2 sono state incubate con il Pdx1 e utilizzate come controllo negativo.

Media e soluzioni

Le cellule contenute nel nostro disegno sperimentale sono state coltivate in diverse condizioni. Tutti i media sono stati filtrati in modo sterile (filtro 0,22 micron) e tenuti al buio a 4 ° C prima dell'uso. RPMI-1640, il terreno di base per tutte le colture cellulari, e il siero fetale bovino (FBS) sono stati ottenuti da GIBCO / Invitrogen (Carlsbad, CA). Tutti i reagenti, se non diversamente specificato, sono stati ottenuti da Sigma (St. Louis, MO). I fattori di crescita, ad eccezione di quelli specificati, sono stati acquistati da R & D Systems (Minneapolis, MN).

-. Kubota Media (KM). coltura di base (RPMI 1640) senza rame, calcio basso (0,3 mM), 10⁻⁹ M Selenio, 0,1% di albumina sierica bovina (BSA), 4,5 mM Nicotinamide, 0.1 nM Zinco Sulfate eptaidrato, 10⁻⁸ M idrocortisone (o desametasone), 5 mg / ml transferrina / Fe, 5 µg / ml di insulina, 10 µg / ml lipoproteine ad alta densità, e una miscela di acidi grassi liberi che vengono aggiunti ad albumina sferica umana purificata. Sopravvivono nel suddetto mezzo cellule epiteliali del fegato mature, vie biliari, del pancreas e non [13]. Queste condizioni sono risultate efficaci nel selezionare ulteriormente cellule EpCAM + e definire la scomparsa delle cellule mesenchimali dopo 6-10 giorni.

- Modified di Kubota Media (MKM). KM privo di siero senza idrocortisone è stato integrato con calcio (concentrazione finale 0,6 mM), rame (10⁻¹² M) e 20 ng / ml bFGF [14, 15].

- Mezzo ad alta definizione per la differenziazione delle cellule insularipancreatiche (HDM-P). MKM, integrato con il 2% B27, 0,1 mM acido ascorbico, 0,25 micron ciclopamina, 1 mM acido retinoico; è stato aggiunto bFGF per i primi 4 giorni e poi sostituito con 50 ng / ml exendin-4 e 20 ng / ml di HGF [14, 16].

- mezzi Pdx1 [0.1 o 0.5 mM]. MKM, integrato con il peptide PDX-1 [0,1 o 0,5 micron].

In differenziazione in vitro di hBTSCs verso il destino del pancreas

La capacità del peptide Pdx1 di indurre differenziazione pancreatica in hBTSCs è stato testato in vitro nel seguente modo. EpCAM + hBTSCs sono stati sottoposti a condizioni di auto-replicazione in senza siero di Kubota Media (KM) e cultura plastica. condizioni di coltura auto-replicante sono state ottenute dall'espansione in vitro privo di siero di Kubota Media (KM), che ha portato alla selezione di una popolazione di cellule staminali / progenitrici positivi per EpCAM e la scomparsa dei fibroblasti e cellule epiteliali mature da fegato umano e dell'albero biliare [9, 11, 13, 14, 16, 17]. Abbiamo recentemente dimostrato [11, 17] che le cellule + EpCAM, ordinate dall'albero biliare di un essere umano adulto e sottoposte a espansione in KM privo di siero, nelle stesse condizioni adottate nell'esperimento, danno luogo a colture di cellule che sono composte da cellule positive EpCAM (> 95 %) , ma rare cellule di origine mesenchimale (<1%) [11]. Le colture sono state mantenute per 6 giorni in KM senza siero. In seguito, gli hBTSCs sono stati incubati per altri 14 giorni a:

- KM;

- . HDM-P;
- . media Pdx1 [0,1 micron];
- . media Pdx1 [0,5 micron].

Inoltre, cellule HepG2, usato come controllo negativo, sono state incubate per 14 giorni a:

- . KM;
- . media Pdx1 [0,1 micron];
- . media Pdx1 [0,5 micron].

La vitalità cellulare, dopo incubazione con differenti concentrazioni di PDX-1, è stata valutata ogni 3 giorni dal test di esclusione trypan blue.

estrazione di proteine e Western Blot (W-B) Analisi

Per l'analisi delle proteine, le cellule sono state lisate in RIPA buffer da differenti inibitori della proteasi. 50 µg di proteine sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12,5%. Le proteine sono state trasferite su membrana PVDF mediante elettroforesi. Una volta trasferite, le membrane sono state bloccate in BSA 5% per 1 ora a temperatura ambiente (RT). L'anticorpo primario Anti His-tag (Cell Signaling Tecnologia; cat #: 2366) è stato incubato a un 1: BSA 1000 diluito al 5% durante la notte, a 4 ° C. La membrana è stata quindi lavata tre volte prima di aggiungere un anticorpo secondario (capra anti di coniglio HRP 1: 10000) per 1 ora a RT.

Analisi della trascrizione inversa reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)

L' RNA totale da colture cellulari è stato estratto tramite le procedure di Chomczynski e Sacchi [18]. L'RNA è stato estratto dal reagente Trizol (Life Technologies, Cat # 15.596-026) secondo le istruzioni del produttore. 1 mg di RNA è stato retrotrascritto utilizzando cDNA ad alta capacità tramite un Kit di trascrizione inversa (Applied Biosystem, cod. 4.368.814). Il cDNA è stato amplificato utilizzando il kit SensiMix SYBR secondo le istruzioni del produttore (Bioline, cod QT605-05.).

I Primer utilizzati sono stati: per l'insulina fw TATAAAGCTGGTGGGCATCC, rev GC-CATGTTGAAACAATGAC; per glucagone fw AGCTGCCTTGTACCAGCATT, rev TGCTCTCTCTTCACCTGCTCT; per la somatostatina fw TGGGTTTCAGACAGCAGCTC, rev CCCAGACTCCGTCAGTTTCT; per CFP fw TTCTCCTTGTACAGGTCCCG, rev GAGAGCGAGAAGTGCCAACT; per Pdx1 fw CATTGGAAGGCTCCCTAACA, rev TCC-CACTGGCATCAATTTCA; per EpCAM ATAACCTGCTCTGAGCGAGTG, rev TGAAGT-GCAGTCCGCAAACCT; per 18S FW GCAATTATTCCCATGAACG, rev GGGACTTAAT-CAACGCAAGC. Per L'espressione del gene di interesse è stato calcolato il rapporto tra le concentrazioni del gene di interesse e le 18S gene di riferimento.

Misurazione della secrezione del peptide-C in hBTSCs

Le cellule sono state lavate tre volte con RPMI privo di glucosio 1640 (GIBCO, catalogo # 11879) e pre-incubate per 12 ore in RPMI 1640 supplementato con 5,5 mM di glucosio, 0,1% BSA, e antibiotici privo di glucosio. Dopo una fase di preincubazione, il terreno è stato rimosso, e le cellule sono state delicatamente lavate tre volte con una concentrazione di glucosio RPMI 1640. Le cellule sono state incubate per 1 ora aggiuntiva in RPMI privo di glucosio 1640 addizionato con 5,5 mM di glucosio e 0,1% BSA. Il risultato

è stato raccolto e conservato a -20°C . Le cellule sono state ancora delicatamente lavate tre volte con RPMI privo di glucosio 1640 poi incubate per 1 ora in RPMI 1640 supplementato con 28 mM di glucosio e 0,1% BSA privo di glucosio. Ancora una volta, il risultato di ciascun pozzetto è stato raccolto e conservato a -20°C . I campioni di culture a 5,5 mm contro 28 mm di glucosio sono stati utilizzati per prove di sintesi del peptide-C. Dopo la raccolta, le cellule sono state raccolte separatamente da ciascun pozzetto e contati con il saggio di esclusione blu Trypan. Il contenuto di peptide-C umano nel mezzo è stata misurata mediante un kit ELISA (Mercodia cod N. 10-1136-01, Uppsala, Svezia) e normalizzato per il numero di cellule di ciascun campione. La quantità di peptide-C generato in risposta alla “sfida del glucosio elevato” è stato diviso per la quantità prodotta dalla “sfide del glucosio basso” per dare l’indice medio di secrezione del peptide-C. L’indice di stimolazione della secrezione del peptide-C è calcolato come rapporto tra il peptide-C secreto nel mezzo sotto elevata concentrazione di glucosio e il peptide-C secreto in condizioni basali (basso) di concentrazione di glucosio; la concentrazione del peptide-C nel mezzo è stata quantificata mediante ELISA nello stesso campione cellulare e durante un periodo di tempo fisso (1 h).

Microscopia ottica (LM) e immunofluorescenza (IF)

Cellule coltivate in camera di diapositive sono stati fissate in acetone per 10 minuti. Le cellule fissate sono state incubate con anticorpi primari (Cavia insulino anti-umano, DAKO, cat # IS002, la diluizione: 1: 100; Coniglio glucagone anti-umano, Santa Cruz Biotechnologie, cat # SC-13091, diluizione: 1:50). In seguito, le cellule sono state lavate e incubate per 1 ora con anticorpi specifici secondari marcati isotopi (porcellino d'India anti-AlexaFluor-488, anti-coniglio AlexaFluor-546, Invitrogen, Life Technologies Ltd,

Paisley, UK) e di contrasto con 4,6-diamidino -2-phenylindole (DAPI) per la visualizzazione dei nuclei cellulari. Per tutte le immunoreazioni, sono stati eseguiti adeguati controlli. I vetrini sono stati esaminati in modo codificato utilizzando una Leica Microsystems DM 4500 B Luce e microscopia a fluorescenza (Wetzlar, Germania) dotato di un Jenoptik Prog Res C10 e Videocam (Jena, Germania). La colorazione è stata analizzata anche da Microscopia confocale (Leica TCS-SP2).

I vetrini sono stati ulteriormente osservati al microscopio a contrasto di fase. E' stato contato in un solo caso il numero di strutture insulari simili (insulino-positivo), la moda in tre campi non sovrapposti (ingrandimento x20) per ogni diapositiva camera; almeno 5 camera di diapositive sono stati esaminati per ogni trattamento.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD). Le analisi statistiche sono state eseguite tramite l'ausilio del software statistico SPSS (SPSS Inc. Chicago IL, USA). Le differenze tra i gruppi per parametri non normali di distribuzione sono stati testati con test Mann-Whitney U. La significatività statistica è stata impostata su un valore di $p < 0.05$.

risultati

produzione Pdx1

è stata ottenuta una Proteina ricombinante di fusione Pdx1, contenente una proteina di trasduzione Domain (PTD) di 16aa (R188-K203), che consente l'internalizzazione delle cellule, collegando 6His-tag al N-terminale della sequenza di amminoacidi (S1 Fig). Una forma 6His-tag di proteine Pdx1 è stata generata seguendo il protocollo sviluppato da Koya et al. [19]. È stata ottimizzata un'espressione eterologa in cellule batteriche fornendo una sequenza nucleotidica atta a codon usage di E. coli e la creazione di condizioni di crescita dopo induzione della proteina ricombinante (S2 Fig). Pdx1 è stato purificato all'omogeneità utilizzando cromatografia ionica di affinità seguita da una seconda fase di filtrazione di gel cromatografia (Fig 1A e 1B). La procedura complessiva ha prodotto 10 mg di Pdx1 proteina per litro di coltura. La purezza della proteina è stata valutata come > 90% sulla base densitometria (Fig 1B). L'identità della proteina purificata è stata confermata mediante una spettrometria di massa MALDI-TOF-TOF. L'analisi Peptide Mass Fingerprinting ha mostrato un profilo con 7 masse peptidiche corrispondenti alle masse teoriche originate da digestione silico sequenza Pdx1 umana (Fig 1C). Inoltre, la determinazione della sequenza peptidica ottenuta mediante isolamento MS / MS e la frammentazione dei due peptidi triptici confermato ulteriormente l'identità della proteina (dati non mostrati).

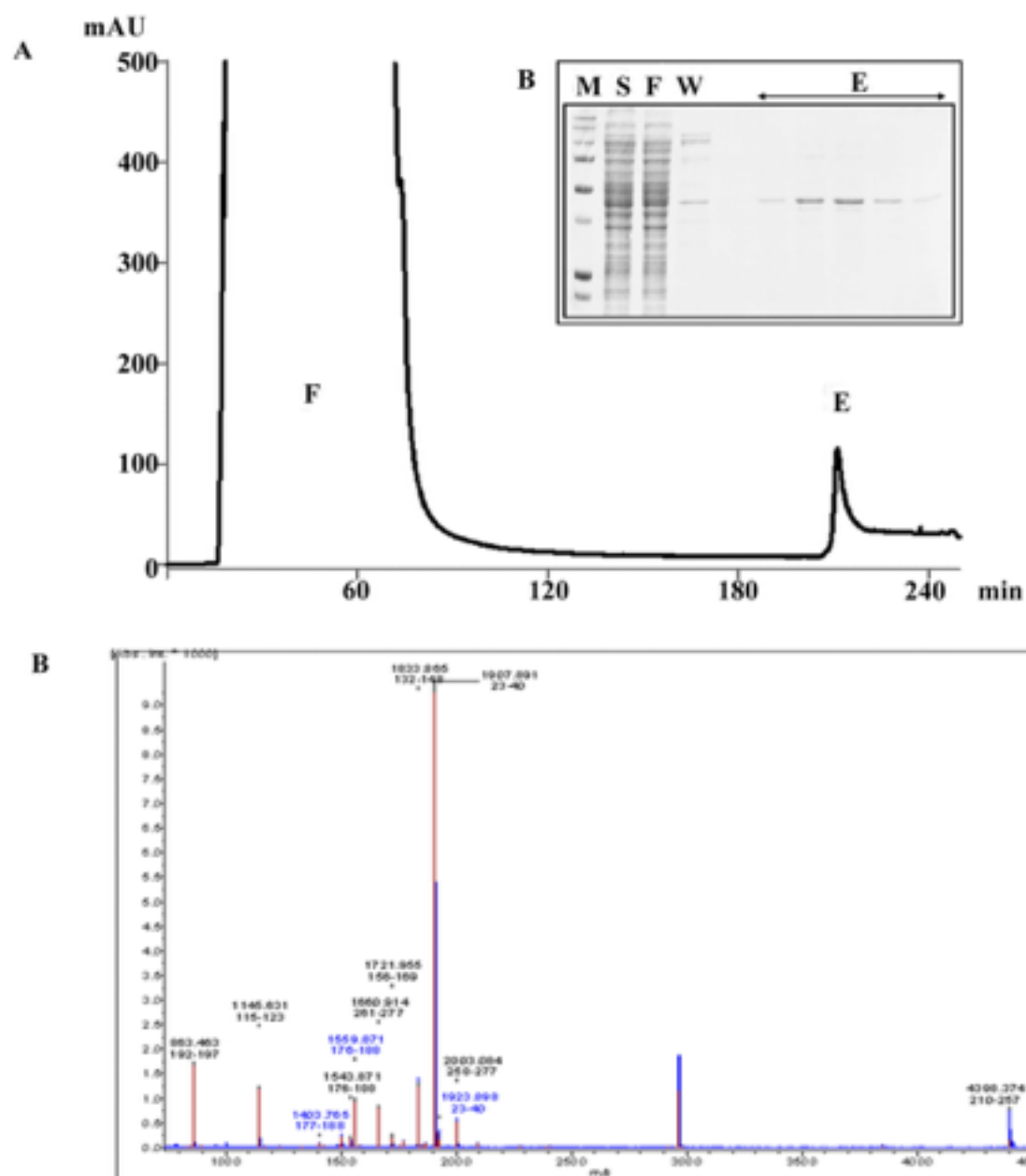


Fig 1. Nickel chelante Sepharose cromatografia di ricombinanti 6His-tagged Pdx1 e l'identità delle proteine Pdx1 purificata dalla spettrometria di massa.

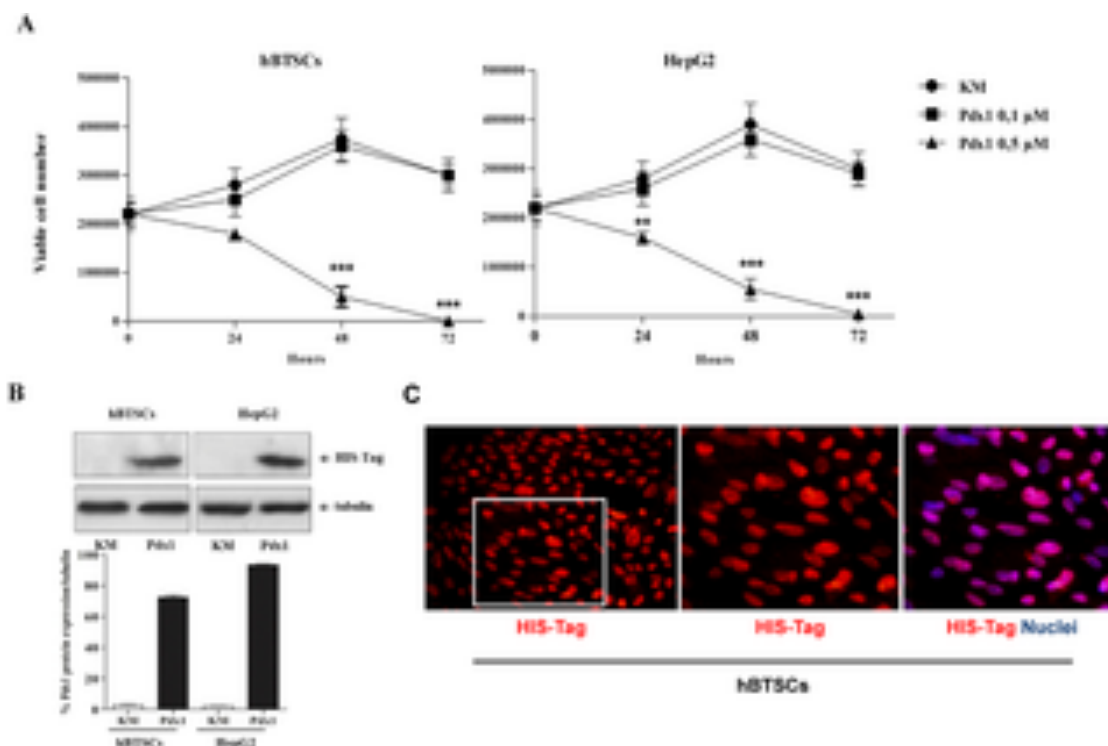
(A) Il lista batterico purificato è stato applicato ad una colonna 10 mL di chelante Sepharose attivato con ioni Ni²⁺. I passaggi cromatografici sono stati seguiti monitorando l'assorbanza a 280 nm. (B) L'inserto mostra analisi di campione lisato [S] SDS-PAGE, flow-through [F], lavare frazioni [W] e eluizione [e] di punta. In parallelo è stato

eseguito il marcatore di peso molecolare [M]. La purezza è stata stimata mediante analisi di immagine di gel SDS-poliacrilammide: la proteina ricombinante 43 kDa è > 90% del contenuto totale di proteine. La resa finale è stata stimata a circa 10 mg per litro di coltura batterica. (C) L'Identità di proteine purificate è stata controllata tramite spettrometria di massa MALDI-TOF-TOF. L'analisi Peptide Mass Fingerprinting ha mostrato un profilo con 7 masse triptiche di peptide di corrispondenza con le masse teoriche originata da digestione silico sequenza PDX1 umano.

doi: 10.1371 / journal.pone.0134677.g001

Interiorizzazione cellulare del peptide PDX1

In primo luogo, abbiamo analizzato l'effetto del trattamento con il Pdx1 sulla vitalità cellulare. Incubazione con 0,1 mM Pdx1 per 3 giorni ha mantenuto vitalità cellulare (Fig 2A) e confluenza delle cellule (in media 90%) sia in cellule hBTSCs e HepG2. Al contrario, il trattamento con 0,5 mM Pdx1 ha determinato una significativa riduzione della vitalità cellulare già dopo 48 h ($p < 0,01$) (Fig 2A). Pertanto, gli esperimenti successivi sono stati condotti utilizzando la concentrazione di 0,1 pM Pdx1.



effetti

Fig 2.

Fig 2 Effetti sulla vitalità delle cellule tramite e internalizzazione di PDX1

*(A) HBSS e HepG2 sono stati esposti a diverse concentrazioni di Pdx1 (0,1 mM o 0,5 pM). L' Incubazione con 0,1 mM Pdx1 ha determinato il mantenimento della vitalità cellulare. Quando le cellule sono state trattate con 0,5 micron Pdx1, la vitalità cellulare è stata significativamente diminuita dopo 48 ore .in entrambi i casi le hBTSCs e HepG2 sono state osservate tramite Trypan con saggio di esclusione blu (i dati sono medie \pm SD di 6 esperimenti; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (B) Dopo 24 ore di trattamento con 0,1 pM Pdx1 proteina ricombinante, l'analisi Western Blot ha mostrato la presenza della proteina ricombinanti Pdx1 (proteina His-Tagged) in hBTSCs trattati e HepG2. Gli istogrammi densitometrici hanno mostrato una pari quantità di protein His-Tagged in hBTSCs e cellule HepG2 trattate con 0,1 mM Pdx1 (i dati sono mezzi \pm DS di 3 esperimenti). (C) l'analisi di immunofluorescenza ha mostrato l'internalizzazione e la traslocazione nucleare della proteina ricombinanti His-Tagged (nuclei rossi) nelle cellule trattate. I nuclei sono visual-*

izzate in blu (DAPI). Ingrandimento Originale = 20X lasciato immagine o 40X immagini giuste.

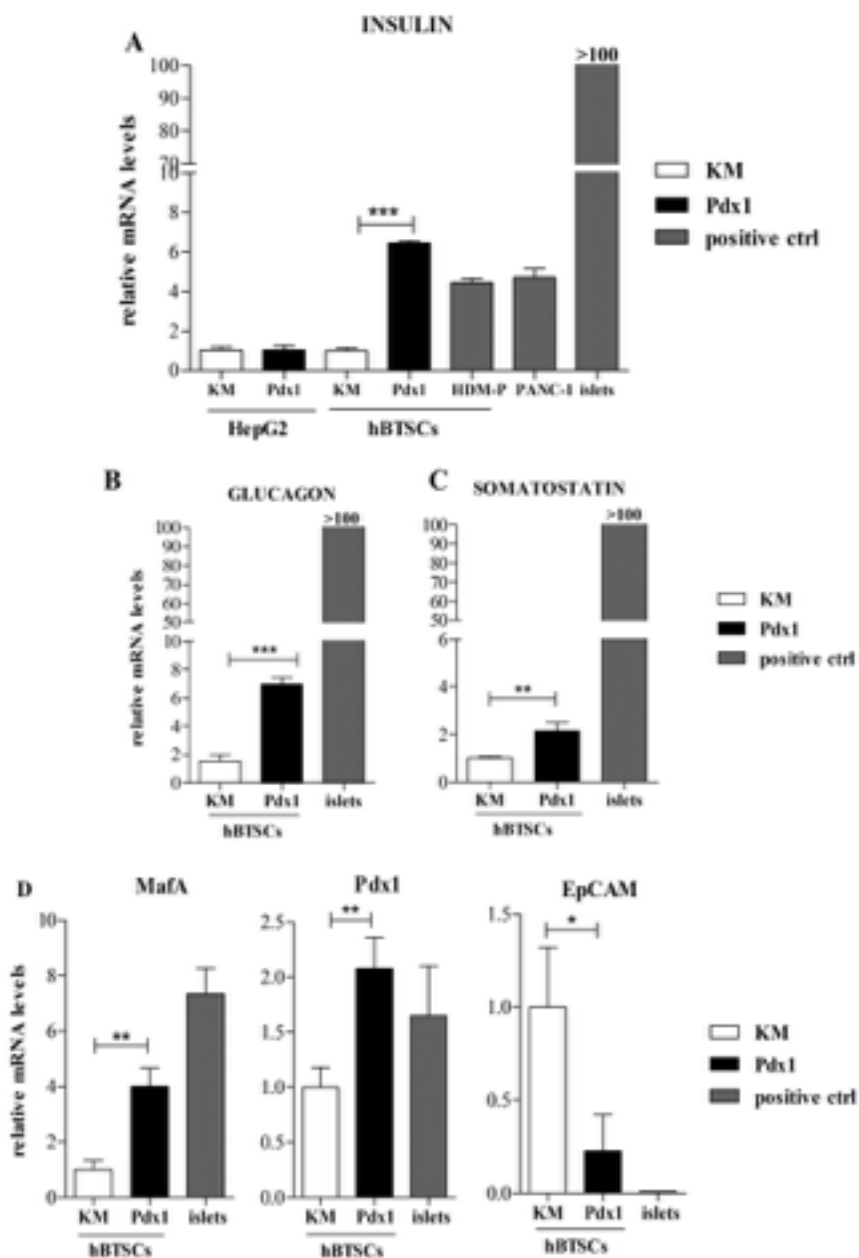
doi: 10.1371 / journal.pone.0134677.g002

L'Analisi W-B ha mostrato la presenza della proteina ricombinanti PDX1 (proteina His-Tagged) in cellule trattate per 24 ore con Pdx1 (Fig 2B). L'assorbimento Pdx1 era comparabile tra hBTSCs e cellule HepG2 come dimostra l'analisi densitometria (Fig 2B). SE ha dimostrato la localizzazione nucleare della Pdx1 esogena; l'internalizzazione cellulare e la localizzazione nucleare della proteina ricombinante His-Tagged sono state evidenziate in entrambi BTSCs (fig 2C) e cellule HepG2 (dati non riportati). Questi risultati hanno mostrato il posizionamento nucleare sicuro ed efficace del Pdx1 ricombinante a 0,1 micron concentrazione.

Efficienza indotta del peptide PDX1 nella differenziazione in vitro di hBTSCs verso cellule delle isole pancreatiche

L'espressione di mRNA per l'insulina è stata analizzata in hBTSCs e cellule HepG2 trattate con il peptide ricombinante Pdx1; come controlli, sono state usate isole pancreatiche umane. L'analisi RT-PCR (Fig 3A) ha dimostrato un aumento dell'espressione di insulina mRNA in hBTSCs coltivate per 14 giorni in mezzo contenente 0,1 mM Pdx1 rispetto hBTSCs mantenute in mezzo di controllo (KM) ($p < 0.01$). Come mostrato in figura 3A, dopo stimolazione con 0,1 mM Pdx1, l'espressione dell'mRNA per l'insulina in hBTSCs risulta essere maggiore di 6 volte rispetto al controllo medio (KM) ($p < 0.01$) e ha mostrato risultati simili a hBTSCs coltivate in HDM-P (4 volte induzione contro KM). È stata osservata alcuna differenza di espressione di mRNA di insulina tra hBTSCs Pdx1-

stimolato e PANC-1 per le cellule (Fig 3A). L'espressione dell'mRNA per l'insulina, in normali isole pancreatiche umane, è risultata significativamente più elevata rispetto a stimulated- (da Pdx1 o HDM-P) -hBTSCs o PANC-1 le cellule ($p < 0,01$). È stata osservata un'induzione dell'espressione insulina mRNA in cellule HepG2 trattate con 0,1 mM Pdx1 rispetto al controllo medio (KM) ($p < 0,05$) (Fig 3A). L'espressione di glucagone (Fig 3B) e la somatostatina (Fig 3C) mRNA significativamente aumentata, da 6- ($p < 0,01$) e 2-pieghe ($p < 0,05$), rispettivamente, in hBTSCs trattati per 14 giorni con 0,1 mM Pdx1 with rispetto a KM da solo. Non è stato osservato nessun effetto invece per quanto riguarda la concentrazione di 0,1 pM Pdx1 sull'espressione glucagone o somatostatina mRNA in cellule HepG2 rispetto al controllo medio (KM) (dati non mostrati). Come osservato per espressione dell'insulina, isole pancreatiche umano hanno mostrato elevati livelli di mRNA di glucagone ($p < 0,01$) (Fig 3B), e la somatostatina ($p < 0,01$) (Fig 3C) rispetto a hBTSCs trattati con Pdx1. Non sono state osservate differenze nella espressione di marcatori per le isole pancreatiche tra hBTSCs stimolati con PDX1 e analizzati al terzo giorno (vedi sopra) rispetto al giorno 30 dopo l'ultima somministrazione di Pdx1 (dati non mostrati). Ciò indica il mantenimento degli effetti Pdx1 per almeno 30 giorni. Abbiamo infine valutato gli effetti del trattamento Pdx1 su marcatori di differenziazione del pancreas. I livelli di mRNA di trascrizione del pancreas fattori CFP e Pdx1 sono stati misurati con il marcatore di cellule staminali epiteliali, EpCAM. Come mostrato in figura 3D, mostrando un aumento significativo di CFP ($p < 0,01$) e Pdx1 ($p < 0,01$). L'mRNA è stato trovato in hBTSCs stimolate con 0,1 mM Pdx1 per 14 giorni rispetto al controllo medio (KM) mentre l'espressione genica EpCAM risulta essere diminuita ($p < 0,01$).



albero biliare di cellule staminali Fig 3. umana (hBTSC) differenziazione verso cellule del pancreas indotta in vitro dal peptide Pdx1.

(A) nelle cellule HepG2 il livello di insulina mRNA non è stata influenzata da 14 giorni di somministrazione di 0,1 micron di pDX1, mentre è aumentata in modo significativo (in media 6 pieghe) in HBSS in coltura per 14 giorni in Kubota Media (KM) contenente 0,1 mM Pdx1i. In confronto con il controllo medio (KM) (dati sono media \pm SD di 6 esperimenti; *** $p < 0.001$). L'effetto della somministrazione Pdx1 su BTSCs era simile al trat-

tamento con un terreno ormonale specifico per la differenziazione delle cellule di isole pancreatiche (HDM-P). PANC-1 le cellule e isole pancreatiche (isolotti) sono stati utilizzati come controlli positivi. (B, C) In hBTSCs coltivate per 14 giorni in KM contenenti 0,1 pM Pdx1, i livelli di glucagone e somatostatina mRNA risultano essere aumentati (dati sono media \pm SD di 6 esperimenti; *** $p < 0,001$) e 2-pieghe (dati sono media \pm SD di 6 esperimenti; ** $p < 0,01$), rispettivamente, in confronto con KM. (D) In hBTSCs in coltura per 14 giorni in KM contenenti 0,1 micron Pdx1, MAFA (4,5 pieghe) (i dati sono medie \pm SD di 6 esperimenti; ** $p < 0,01$) o Pdx1 (2-pieghe) (i dati sono mezzi \pm SD di 6 esperimenti; ** $p < 0,01$) genica aumentata rispetto KM, mentre EpCAM mRNA diminuita (media 4 pieghe) (dati sono media \pm SD di 6 esperimenti; * $p < 0,05$).

caratterizzazione morfologica e funzionale delle isole pancreatiche beta-hBTSC di derivazione Pdx1 indotti

Molto importante, sono state osservate diverse strutture insulari (più di 5 per ogni diapositiva) quando le cellule hBTSCs sono state stimulate per 14 giorni con 0,1 mM Pdx1 ($p < 0,01$ vs KM; Fig 4A), e questo risultato è simile a hBTSCs coltivate in HDM -P. Queste neoisole indotte d Pdx1 erano composte da cellule confezionate positivamente per l'insulina e il glucagone (Fig 4A). Al contrario, le strutture insulari non sono state osservate in hBTSCs mantenute in un mezzo di controllo (KM) (Fig 4A). Infine, per valutare la differenziazione funzionale effettiva verso le cellule endocrine del pancreas, abbiamo analizzato, mediante ELISA, la secrezione di peptide-C dopo aver innestato in hBTSCs un' alta concentrazione di glucosio. Le isole pancreatiche umane (isolotti) sono state utilizzate come mezzo di controllo positivo. Cellule hBTSCs coltivate per 14 giorni in 0.1 pM Pdx1 ($n = 7$) sono state esposte a bassa concentrazione di glucosio (5,5 mM)

rispetto (28 mM) per stimolare la secrezione di peptide-C (Fig 4B). Cellule hBTSCs coltivate in km non sono riuscite a secernere peptide-C dopo l'unione con il glucosio, senza essere trattate con il Pdx1. Al contrario, nel hBTSCs trattati con Pdx1 per 14 giorni, la secrezione di peptide-C umano nel mezzo a basso livello di glucosio ($0.22 \pm 0.036 \text{ ug / L / 60 min}$) risulta essere triplicato quando le cellule sono state trattate con un'alta concentrazione di glucosio ($0,6 \pm 0,046 \text{ ug / L / 60 min}$; $p < 0,05$). L'indice di stimolazione di rilascio del peptide-C misurato nelle hBTSCs stimolate con Pdx1 è risultato essere simile rispetto a quello calcolato in normali isole pancreatiche umane (indice di secrezione = $3.02 \pm 0,1$ vs $3,4 \pm 0,1$, rispettivamente).

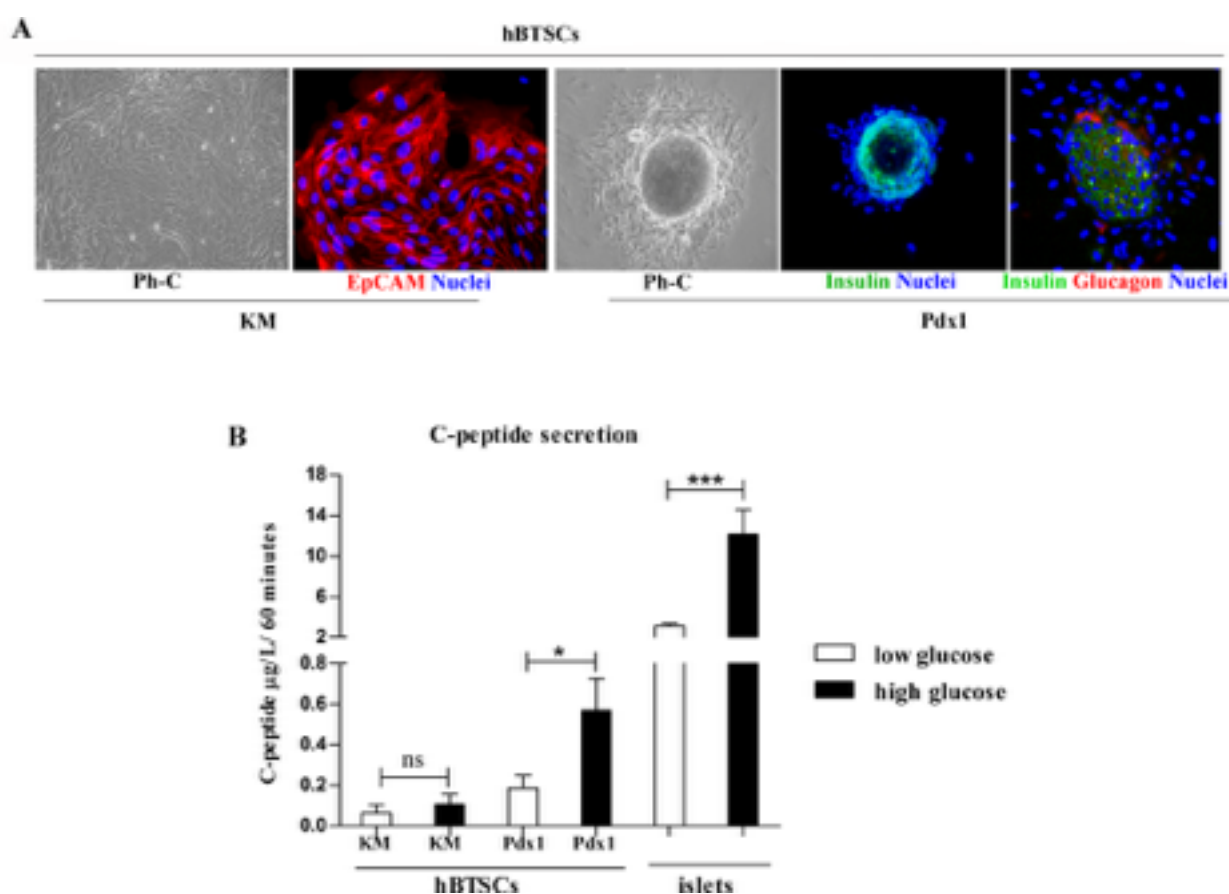


Fig 4. cellule beta-pancreatiche hBTSC-derivati inetti tramite Pdx1 funzionano attivamente.

*(A) Morfologicamente (contrasto di fase: Ph-C; Originale Ingrandimento = 10X), dopo 14 giorni in condizioni basali, hBTSCs ha formato grandi colonie composte da piccoli, densi, e uniformi lcellule EpCAM-positive (immunofluorescenza per EpCAM; Originale Ingrandimento = 20X). Dopo 14 giorni in colture contenenti 0,1 micron di Pdx1, son state rilevate diverse strutture simili ad isole pancreatiche (contrasto di fase: Ph-C; Originale Ingrandimento = 10X); queste strutture sono state per lo più composte da cellule insulino-positive (immunofluorescenza per l'insulina; Originale Ingrandimento = 10X); e alcune cellule glucagone-positive son state rilevate nella periferia di queste strutture insulari (doppia immunofluorescenza per insulina e glucagone; ingrandimento originale = 20X). (B) punto di vista funzionale, hBTSCs a Kubota Media (KM) o in km, più di 0,1 micron Pdx1 sono stati esposti a basse (5,5 mM) o alte (28 mM) concentrazioni di glucosio per stimolare la secrezione del peptide-C. Il risultato è stato confrontato con isole pancreatiche umane (isolotti). Non è stata influenzata dalla stimolazione con alto contenuto di glucosio la secrezione di peptide-C umano in hBTSCs in KM n(i dati sono medie \pm SD di 6 esperimenti). In hBTSCs coltivate per 14 giorni in KM contenenti 0,1 pM Pdx1, è stato rilevato secrezione di Peptide-C a bassi livelli di glucosio, che risulta essere ulteriormente aumentata dopo l'esposizione delle cellule ad alte concentrazioni di glucosio (dati sono media \pm SD di 6 esperimenti; * $p < 0,05$). Le isole pancreatiche umane (isolotti) sono stati utilizzati come controllo positivo (i dati sono medie \pm SD di 6 esperimenti; * $p < 0,05$).*

doi: 10.1371 / journal.pone.0134677.g004

Discussione

Complessivamente i nostri risultati indicano che la nuova sintesi ricombinante con Pdx1 mostra un efficiente lignaggio limitato sulle cellule hBTSCs insulari funzionali beta-pancreatiche. L'efficiente produzione di peptide ricombinante attivo Pdx1 umano è stato ottenuto clonando l'intera sequenza del gene PDX1 umano contenente una sequenza funzionale codificante per un dominio di proteine di trasduzione. La proteina è stata resa facilmente recuperabile da una bobina terminale istidine poli che codifica efficientemente la proteina. L'identità delle proteine purificate è stata dimostrata mediante MALDI-TOF-TOF spettrometria di massa.

Lo scopo principale del nostro studio è stato quello di valutare la capacità del Pdx1 ricombinante ad indurre la differenziazione di una popolazione di normali cellule hBTSCs verso le cellule beta del pancreas-[6-11]. Mentre l'internalizzazione delle cellule Pdx1 è stata osservata in cellule hBTSCs e cellule HepG2, la comparsa di cellule in grado di produrre insulina funzionale era evidente solo in hBTSCs. Le Dimostrazioni di uguali quantità di Pdx1 assorbimento e adeguata localizzazione delle Pdx1 nelle cellule hBTSCs e HepG2 sono stati ottenuti sia da WB e IF. Ciò esclude la possibilità che il mal-funzionamento di Pdx1 ad indurre il differenziamento pancreatico in cellule HepG2 sia stato causato dal suo assorbimento compromesso. Il legame del peptide Pdx1 alla cromatina è stato solo indirettamente valutato mediante colorazione nucleare. Tuttavia, tutti gli effetti biologici osservati dopo una somministrazione esogena Pdx1 possono essere determinati efficacemente, poiché erano del tutto compatibili con il ruolo del fattore di

trascrizione nell'indurre la differenziazione delle cellule staminali endodermali verso cellule pancreatiche[20]. L'induzione efficace della produzione di insulina da Pdx1 in hBTSCs è stata dimostrata dal marcato aumento di insulino-mRNA (6 volte rispetto hBTSCs di controllo), la comparsa di insulina positiva nelle neo-isole (IF) e, infine, dalla secrezione Cdi peptide-C in mezzo di coltura (ELISA). L'osservazione di un parallelo aumento del glucagone e somatostatina sostiene ulteriormente il ruolo attivo di Pdx1 nell'indurre la differenziazione endocrina di hBTSCs. In particolare, un' ulteriore prova di un vero e proprio ruolo di pro-differenziazione del Pdx1 ricombinante in hBTSCs nasce dall' aumento parallelo di isole pancreatiche in fattori di trascrizione (CFP, Pdx1), e la diminuzione dello stelo marker endodermico delle cellule EpCAM. le neoisole indotte tramite Pdx1 son risultate essere funzionalmente attive, poiché hanno risposto ad elevata concentrazione di glucosio triplicando la secrezione di peptide-C, e questa risposta era simile a quella osservate in isole pancreatiche umane sane. Inoltre, la capacità del peptide Pdx1 di indurre differenziazione pancreatica di hBTSCs era paragonabile a quella osservata q coltivate in cellule coltivate in un mezzo studiate appositamente per la differenziazione pancreatica (cioè HDM-P media) (1-6). Rispetto ai isole pancreatiche umane, le hBTSCs stimolate con Pdx1 hanno mostrato minore espressione di secrezione di insulina e peptide-C, che indica la differenziazione incompleta verso isole pancreatiche completamente mature. Tuttavia, la popolazione hBTSC è eterogenea e questo potrebbe giustificare una risposta eterogenea dei diversi componenti cellulari. Infatti, in condizioni di auto-replicazione nelle culture hBTSC, nella popolazione di cellule predominantem ha mostrato un fenotipo simile a cellule staminali endodermico (EpCAM + / K7 + / LGR5 + / SOX17 + / PDX1 +). era anche presente (<10%) una sottopopolazione più ristretta di cellule con caratteristiche pluripotenza (SOX2 + / OCT4A + / NANOG +) [11].

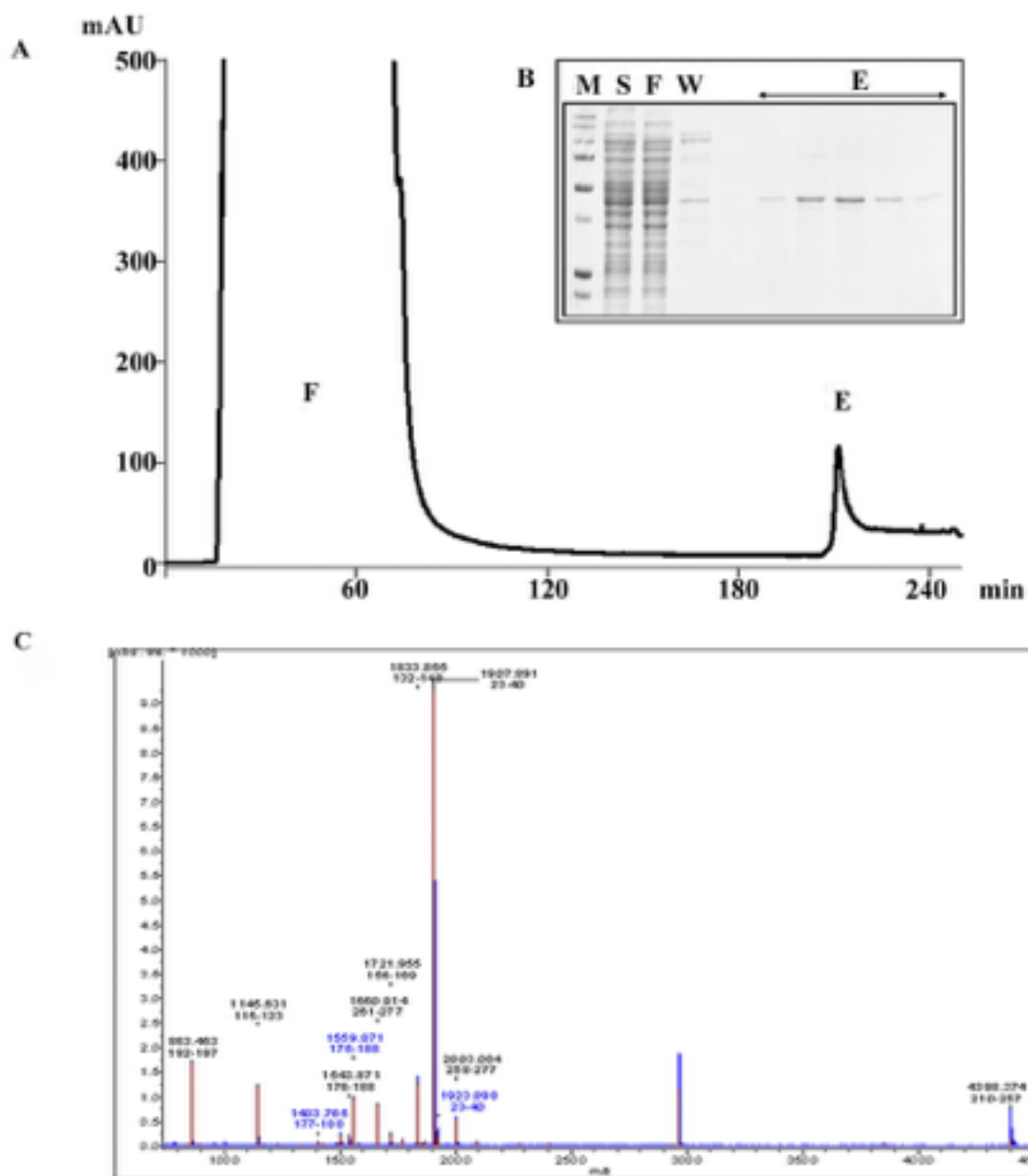
L'effetto del peptide Pdx1 su sottopopolazioni hBTSC selezionate sarà l'obiettivo dei prossimi studi. Negli ultimi anni, sono stati proposti diversi tentativi di riprogrammare cellule del fegato in cellule endocrine pancreatiche [1-3]. Nel nostro studio, il fallimento di Pdx1 di indurre la differenziazione del pancreas di cellule HepG2 epatiche mature, nonostante l'internalizzazione del peptide, è in linea con le recenti indagini dove cellule parenchimali del fegato hanno mostrato grandi differenze nel differenziarsi in cellule pancreatiche [4]. Livelli Pdx1, con segnalazione Notch, modulano la differenziazione equilibrata delle cellule progenitrici / staminali contro il pancreas endocrino piuttosto che contro l'albero biliare [20-25]. Pdx1 è stato osservato in colecisti e nei dotti biliari (ma non parenchima epatico) durante lo sviluppo embrionale e in alcune certe malattie [26, 27]. Difetti di Notch sono stati segnalati per accelerare la differenziazione del pancreas endocrino delle cellule dei dotti biliari guidati da Pdx1 e Ngn3 [20-25]. In questo modo, hBTSCs conservano, naturalmente, i fattori di potenzialmente guida del pancreas endocrino per la differenziazione / esocrina. Nello studio di Banga et al. [5], è stato individuato Sox9 positività, che segna progenitori, di tipi di cellule che possono essere riprogrammate per divenire cellule pancreatiche per la sovraespressione di tre fattori di trascrizione (Pdx1, Ngn3 e CFP). I tratti fenotipici e la localizzazione di queste cellule corrispondono quella di hBTSCs [5-11, 21]. Nel nostro studio, il peptide Pdx1 esogeno induce una sovra-espressione di fattori di trascrizione a valle (CFP), implicati nella specifica endocrino del pancreas. Così, i nostri risultati, sono coerenti con i dati di embriologia dello sviluppo e con la dimostrazione che le cellule positive Pdx1 presenti in natura all'interno PBG tdi utto l'albero biliare. Inoltre, Pdx1 ha dimostrato di giocare un ruolo attivo durante le patologie associate alla proliferazione biliare hBTSC [6-11, 21, 28, 29]. Questo indica un fenotipo neuroendocrino associato ad una domanda biliare rigen-

erativa. Per la valutazione in situ sono necessari esperimenti in modelli pre-clinici del diabete mellito per la differenziazione in isole Pdx1-mediata di hBTSCs. La dimostrazione che il peptide ricombinante Pdx1 umano da solo esercita effetti simili in vitro, rispetto al mezzo ormonalmente definito in misura per le cellule pancreatiche, è particolarmente importante in vista dei tentativi per modulare il vano hBTSC in vivo, dove ormoni e fattori di crescita hanno limitato applicazioni a causa dei loro effetti sistemici. La selettività degli effetti osservati in Pdx1 hBTSCs rispetto ad epatociti maturi (HepG2) potrebbe facilitare un selettivo in vivo per la modulazione di hBTSCs, tramite somministrazione sistematica di Pdx1. A questo proposito, la reattività specifica di elementi ghiandolari di grandi vie biliari intraepatiche a fattori di trascrizione pancreatiche somministrati per via sistemica è stata già dimostrata in un modello di topo [5]. La configurazione cromatina di hBTSCs, infatti, potrebbe favorire l'accesso ai fattori di trascrizione pancreatiche e, la loro eccessiva espressione potrebbe essere efficace nella riprogrammazione cellulare [5]. Una strategia pionieristica potrebbe essere basata su un selettivo delle Pdx1 per hBTSCs trogolo nano-particelle EpCAM mirati carichi di Pdx1.

Informazioni di supporto

ATGGACGGTGAAGAACAGTACTACGCGGCGACGCAGCTGTACAAGGACCCATGTGCGTTC	60
M N G E E Q Y Y A A T Q L Y K D P C A F	20
CAGCGTGGCCAGCCCCAGAATTTCAGCGCCTCTCCACCAGCCTGTTTATACATGGGTTCGC	120
Q R G P A P E F S A S P P A C L Y M G R	40
CAGCCACCGCCACCGCCGCCACCCATTTCCGGGTGCGTTAGGCGCGCTGGAACAAGGT	180
Q P P P P P H P F P G A L G A L E Q G	60
AGCCCACCAGATATTAGCCCGTACGAGGTGCCGCCGCTGGCGGACGATCCGGCGGTTGCG	240
S P P D I S P Y E V P P L A D D P A V A	80
CATTTACATCATCATTTACCAGCCCAGTTAGCCTTACCGCATCCGCCAGCCGGTCCGTTT	300
H L H H H L P A Q L A L P H P P A G P F	100
CCGGAAGGCGCGGAACCAGGTGTTCTGGAAGAACCAATCGCGTGCAGTTACCGTTCCCG	360
P E G A E P G V L E E P N R V Q L P F P	120
TGGATGAAATCTACGAAAGCCCATGCGTGGAAGGGCCAGTGGCGGGTGGTGCGTACGCG	420
W M K S T K A H A W K G Q W A G G A Y A	140
GCCGAGCCAGAGGAAAATAAGCGTACGCGTACGGCGTATACGCGTGCCCAACTGCTGGAG	480
A E P E E N K R T R T A Y T R A Q L L E	160
CTGGAGAAGGAATTTCTGTTTAAACAAGTACATCTCTCGCCCGGTCGTGTGGAATTAGCG	540
L E K E F L F N K Y I S R P R R V E L A	180
GTTATGCTGAATCTGACCGAGCGTCATATCAAGATTTGGTTCCAGAACCCTCGCATGAAA	600
V M L N L T E <u>R H I K I W F Q N R R M K</u>	200
TGGAAGAAGGAGGAGGATAAGAAGCGTGGCGGCGGTACCGCCGTGGGTGGCGGTGGCGTG	660
<u>W K K</u> E E D K K R G G G T A V G G G V	220
GCCGAACCGGAACAGGACTGTGCCGTTACGAGCGGCGAAGAGTTATTAGCGCTGCCGCCG	720
A E P E Q D C A V T S G E E L L A L P P	240
CCGCCACCACCGGGCGGTGCGGTTCCACCAGCCGCCCCAGTGCCCGCGCGTGAAGGCCGC	780
P P P P G G A V P P A A P V A A R E G R	260
TTACCACCGGGTCTGTCTGCGTCTCCACAGCCATCTTCTGTGGCGCCACGCCGTCCGCAA	840
L P P G L S A S P Q P S S V A P R R P Q	280
GAACCACGTTGA	852
E P R stop	283

La sequenza completa di DNA codificante per PDX1 umano (852 bp codifica per 283 aa) adatto per l'espressione eterologa in *E. coli* è stata fornita da GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ). La proteina di trasduzione Domain (PTD), 16aa (R188-K203), permette di internalizzazione le cellule della proteina completa. Il Pdx1 ricombinante è stato ottenuto sotto forma di proteina di fusione collegando 6His-tag al N-terminale della sequenza di amminoacidi.



Dopo la digestione con *Nde*I e *Bam*HI, l'amplicone è stato ligato in espressione pET-28a vettore (Novagen-Merck, Darmstadt, Germania), ottenendo con animali un plasmide PDX1. Questo costrutto è stato utilizzato per trasformare un ceppo di *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen).

Ringraziamenti

V. C., G. C., L. R., E. G., D. A. sono inventori di un brevetto internazionale in materia di hBTSCs. la FDG + in possesso di un brevetto relativo alla Pdx1 ricombinante utilizzato in questo studio. Prof. Domenico Alvaro è garante di questo lavoro e, come tale, avuto pieno accesso a tutti i dati dello studio e prende la responsabilità per l'integrità dei dati e l'accuratezza dell'analisi dei dati.

Contributi degli Autori

Ideatore e progettista: VC, R Puca, GC, EG, MM, DA. Esecutori degli esperimenti: GS, AR, MDC, FS, LN, DC, R Panetta, GF. Analizzatori dei dati: VC, R Puca, R Panetta, GC, EG, MM, DA, LR, GF. Contributi / materiali / strumenti di analisi reagenti: PB. Scrittori dell'articolo: VC, R Puca, GC, EG, MM, DA, GF.

Riferimenti

1. Delisle JC, Martignat L, Dubreil L, Sai P, Bach JM, Louzier V, et al. Pdx-1 or Pdx-1-VP16 protein transduction induces beta-cell gene expression in liver-stem WB cells. BMC research notes. 2009;2:3. doi: 10.1186/1756-0500-2-3 pmid:19134185; PubMed Central PMCID: PMC2637887.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

2. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8078–83. doi: 10.1073/pnas.122210699 pmid:12048252; PubMed Central PMCID: PMC123023.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

3. Chen NK, Wong JS, Kee IH, Lai SH, Thng CH, Ng WH, et al. Nonvirally modified autologous primary hepatocytes correct diabetes and prevent target organ injury in a large preclinical model. *PLoS One*. 2008;3(3):e1734. doi: 10.1371/journal.pone.0001734 pmid:18320053; PubMed Central PMCID: PMC2249706.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

4. Yechool V, Liu V, Espiritu C, Paul A, Oka K, Kojima H, et al. Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes. *Developmental cell*. 2009;16(3):358–73. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.012 pmid:19289082; PubMed Central PMCID: PMC2676438.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

5. Banga A, Akinci E, Greder LV, Dutton JR, Slack JM. In vivo reprogramming of Sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(38):15336–41. doi: 10.1073/pnas.1201701109 pmid:22949652; PubMed Central PMCID: PMC3458366.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

6. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Cui CB, Gatto M, Rossi M, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology*. 2011;54(6):2159–72. doi: 10.1002/hep.24590 pmid:21809358.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

7. Carpino G, Cardinale V, Onori P, Franchitto A, Berloco PB, Rossi M, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *Journal of anatomy*. 2012;220(2):186–99. doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01462.x pmid:22136171; PubMed Central PMCID: PMC3275774.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

8. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Mendel G, Alpini G, Gaudio E, et al. The biliary tree —a reservoir of multipotent stem cells. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(4):231–40. doi: 10.1038/nrgastro.2012.23 pmid:22371217.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

9. Semeraro R, Carpino G, Cardinale V, Onori P, Gentile R, Cantafora A, et al. Multipotent stem/progenitor cells in the human foetal biliary tree. *Journal of hepatology*. 2012;57(5):987–94. doi: 10.1016/j.jhep.2012.07.013 pmid:22820480.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

10. Wang Y, Lanzoni G, Carpino G, Cui CB, Dominguez-Bendala J, Wauthier E, et al. Biliary tree stem cells, precursors to pancreatic committed progenitors: evidence for possible life-long pancreatic organogenesis. *Stem cells*. 2013;31(9):1966–79. doi: 10.1002/stem.1460 pmid:23847135; PubMed Central PMCID: PMC3796013.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

11. Carpino G, Cardinale V, Gentile R, Onori P, Semeraro R, Franchitto A, et al. Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder. *Journal of hepatology*. 2014;60(6):1194–202. doi: 10.1016/j.jhep.2014.01.026 pmid: 24530598.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

12. Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(1):51–9. doi: 10.1172/JCI40553 pmid:20051636; PubMed Central PMCID: PMC2798698.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

13. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1973–87. doi: 10.1084/jem.20061603 pmid:17664288; PubMed Central PMCID: PMC2118675.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

14. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Cui CB, Gatto M, Rossi M, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology*. 2011;54(6):2159–72. pmid:21809358. doi: 10.1002/hep.24590.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

15. Wang Y, Yao HL, Cui CB, Wauthier E, Barbier C, Costello MJ, et al. Paracrine signals from mesenchymal cell populations govern the expansion and differentiation of human hepatic stem cells to adult liver fates. *Hepatology*. 2010;52(4):1443–54. pmid: 20721882. doi: 10.1002/hep.23829.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

16. Wang Y, Lanzoni G, Carpino G, Cui C, Dominguez-Bendala J, Wauthier E, et al. Biliary Tree Stem Cells, Precursors to Pancreatic Committed Progenitors, Evidence for Life-long Pancreatic Organogenesis. *Stem cells*. 2013;in press. doi: 10.1002/stem.1460

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

17. Riccio M, Carnevale G, Cardinale V, Gibellini L, De Biasi S, Pisciotta A, et al. The Fas/Fas ligand apoptosis pathway underlies immunomodulatory properties of human bil-

iary tree stem/progenitor cells. *Journal of hepatology*. 2014;61(5):1097–105. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.016 pmid:WOS:000343839900018.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

18. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*. 2006;1(2):581–5. doi: 10.1038/nprot.2006.83 pmid:17406285.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

19. Koya V, Lu S, Sun YP, Purich DL, Atkinson MA, Li SW, et al. Reversal of streptozotocin-induced diabetes in mice by cellular transduction with recombinant pancreatic transcription factor pancreatic duodenal homeobox-1: a novel protein transduction domain-based therapy. *Diabetes*. 2008;57(3):757–69. doi: 10.2337/db07-1441 pmid:18086901; PubMed Central PMCID: PMC3418347.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

20. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 1996;122(3):983–95. pmid:8631275.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

21. Fukuda A, Kawaguchi Y, Furuyama K, Kodama S, Horiguchi M, Kuhara T, et al. Ectopic pancreas formation in Hes1-knockout mice reveals plasticity of endodermal progenitors of the gut, bile duct, and pancreas. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(6):1484–93. doi: 10.1172/JCI27704 pmid:16710472; PubMed Central PMCID: PMC1462947.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

22. Spence JR, Lange AW, Lin SC, Kaestner KH, Lowy AM, Kim I, et al. Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Developmental cell*.

2009;17(1):62–74. doi: 10.1016/j.devcel.2009.05.012 pmid:19619492; PubMed Central PMCID: PMC2734336.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

23. Sumazaki R, Shiojiri N, Isoyama S, Masu M, Keino-Masu K, Osawa M, et al. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nature genetics*. 2004;36(1):83–7. doi: 10.1038/ng1273 pmid:14702043.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

24. Wandzioch E, Zaret KS. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. *Science*. 2009;324(5935):1707–10. doi: 10.1126/science.1174497 pmid:19556507; PubMed Central PMCID: PMC2771431.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

25. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1607–11. pmid:10677506; PubMed Central PMCID: PMC26482. doi: 10.1073/pnas.97.4.1607

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

26. Marzioni M, Saccomanno S, Agostinelli L, Rychlicki C, De Minicis S, Pierantonelli I, et al. PDX-1/Hes-1 interactions determine cholangiocyte proliferative response to injury in rodents: possible implications for sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology*. 2013;58(4):750–6. doi: 10.1016/j.jhep.2012.11.033 pmid:23207146.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

27. Sahu S, Tosh D, Hardikar AA. New sources of beta-cells for treating diabetes. *The Journal of endocrinology*. 2009;202(1):13–6. doi: 10.1677/JOE-09-0097 pmid:19420008.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

28. Igarashi S, Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Participation of peribiliary glands in biliary tract pathophysiologies. *World journal of hepatology*. 2013;5(8):425–32. doi: 10.4254/wjh.v5.i8.425 pmid:24023981; PubMed Central PMCID: PMC3767841.

[View Article PubMed/NCBI Google Scholar](#)

29. Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y, Cui CB, Carpino G, Cardinale V, et al. Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. *Stem cells*. 2013;31(10):2047–60. doi: 10.1002/stem.1457 pmid:23873634; PubMed Central PMCID: PMC3812254.

Gli autori

Vincenzo Cardinale, Rosa Puca, Gaia Scafetta, Lorenzo Nevi, Marella Maroder, Domenico Alvaro

Dipartimento di Scienze medico-chirurgico e Biotecnologie, Università La Sapienza di Roma, Roma, Italia

Guido Carpino

Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Roma "Foro Italico", Roma, Italia

Michele De Canio, Francesca Sicilia, Giorgio Federici

Dipartimenti di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Tor Vergata, Roma, Italia

Domenico Casa, Rocco Panetta

Federazione Italiana di diabete giovanile (FDG), Roma, Italia

Pasquale Bartolomeo Berloco

Dipartimento di Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

Lola M. Reid

Dipartimenti di cellulare e fisiologia molecolare, Programma di Biologia Molecolare e Biotecnologie, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina, Stati Uniti d'America

Anastasia Renzi, Eugenio Gaudio

Dipartimento di Anatomia, istologici, Medicina Legale e Scienze ortopedia, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

Domenico Alvaro

Eleonora Lorillard Fondazione Spencer-Cenci, Roma, Italia

Autore Corrispondente

E-mail: domenico.alvaro@uniroma1.it

Interessi conflittuali

VC GC LR EG DA sono gli inventori di un brevetto internazionale in materia di hBTSCs. La FDG è in possesso di un brevetto relativo alla Pdx1 ricombinante utilizzato in questo studio. 1) brevetto nazionale. Italia. La domanda di brevetto n. : N. 0001360239, Data di deposito 21/10/2005 Roma, Titolo. PROTEINE OMEOTICHE PER LA CURA DEL DIABETE DI TIPO mellito 1 o 2 INSULINOTRATTATO; 2) Brevetto internazionale. Domanda di brevetto statunitense No.:61/256,846, Data di deposito: 10/30/2009; Titolo: cellule staminali multipotenti DAL extraepatica BILIARE ALBERO E AI METODI DI ISOLAMENTO STESSA; 3) di brevetto internazionale. Domanda di brevetto statunitense n ° WO2014143632 A1; Data di deposito: 2014/03/13; Titolo: metodo di trattamento CON-

DIZIONI al pancreas e fegato, trapianto di cellule staminali nelle pareti del dotto biliare. Ciò non toglie la nostra adesione alle politiche di PLoS ONE in materia di dati e la condivisione di materiale.

[Traduzione in italiano. Articolo originale in Inglese disponibile su <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134677>]