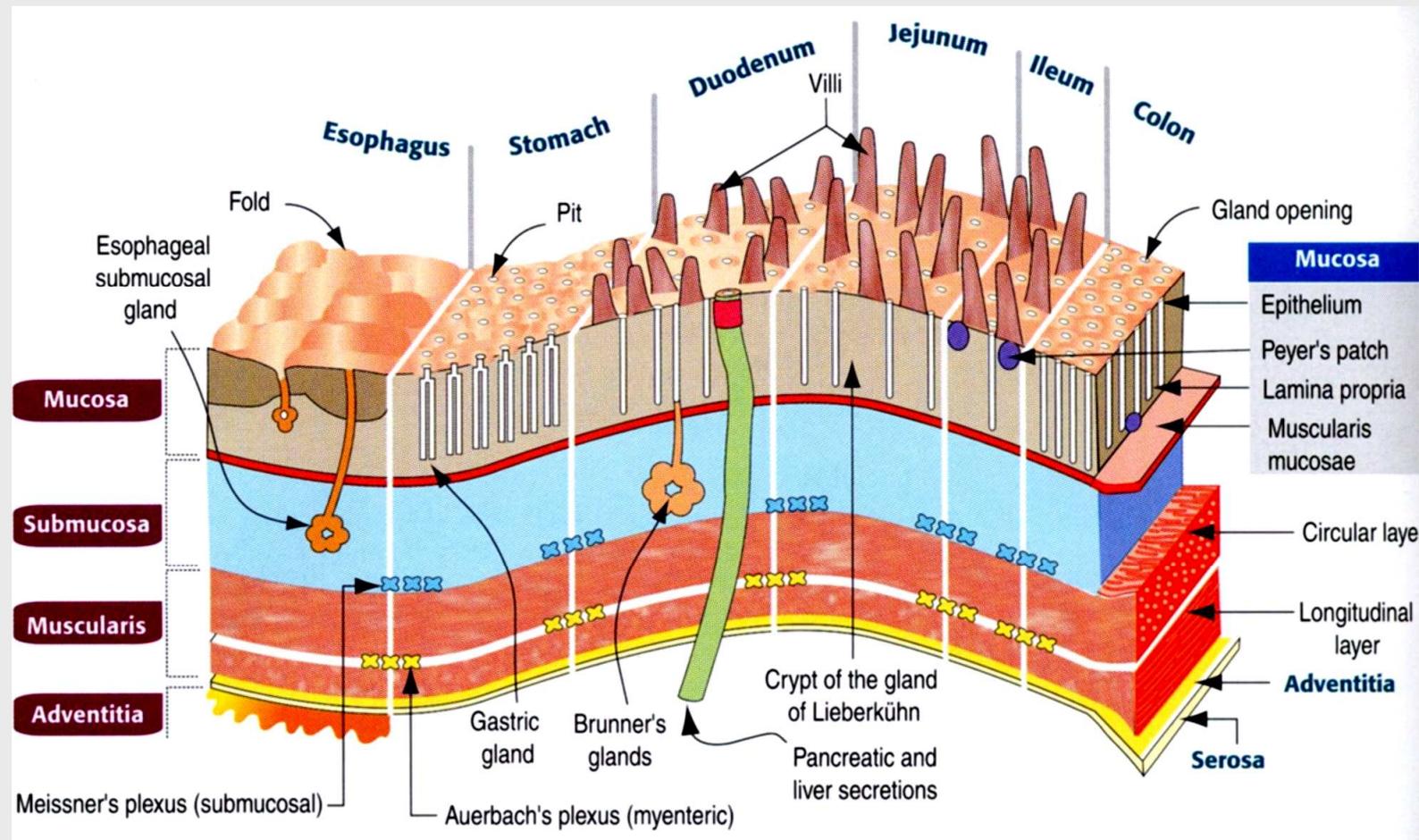
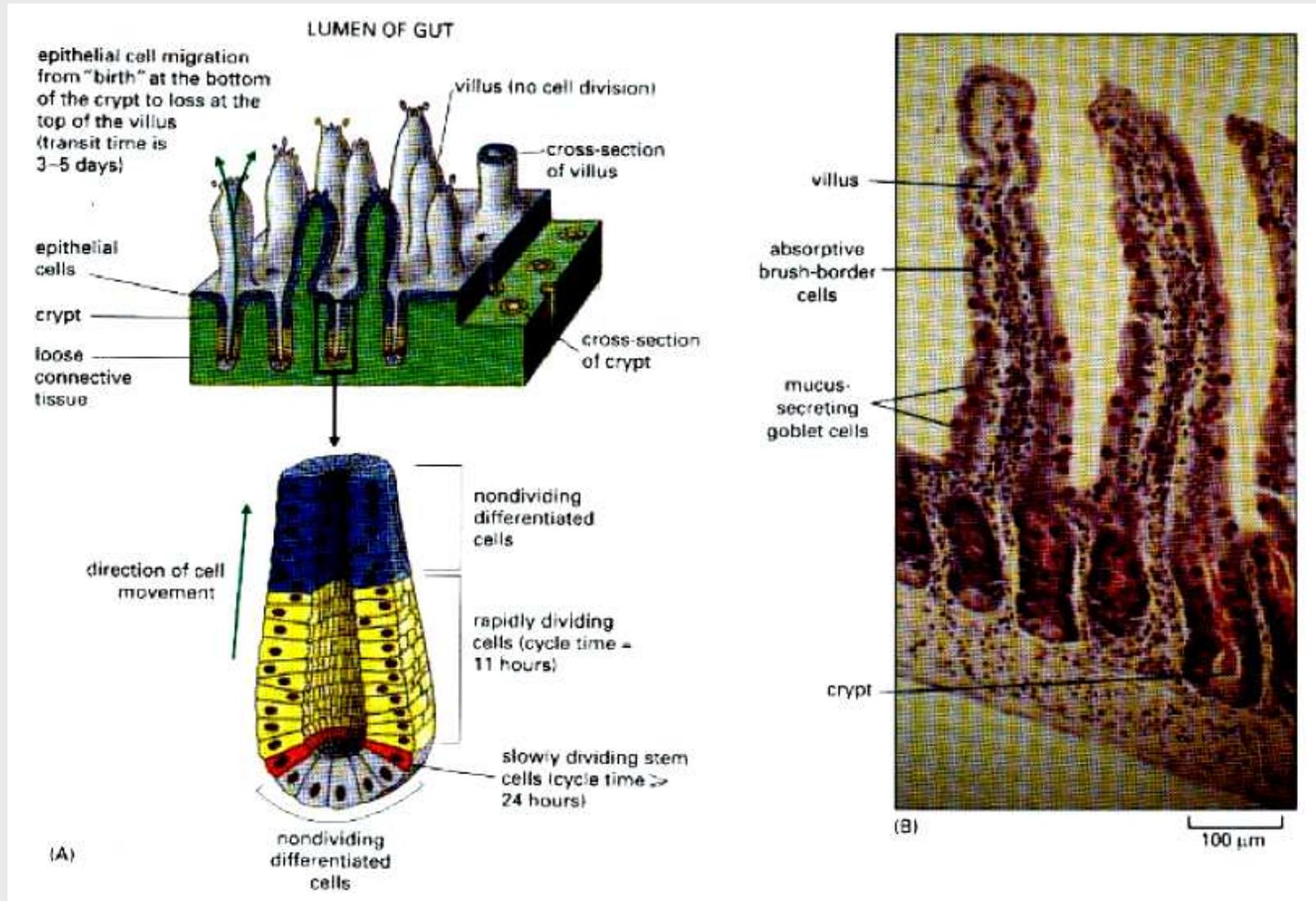


Sviluppo dell'apparato gastro- enterico

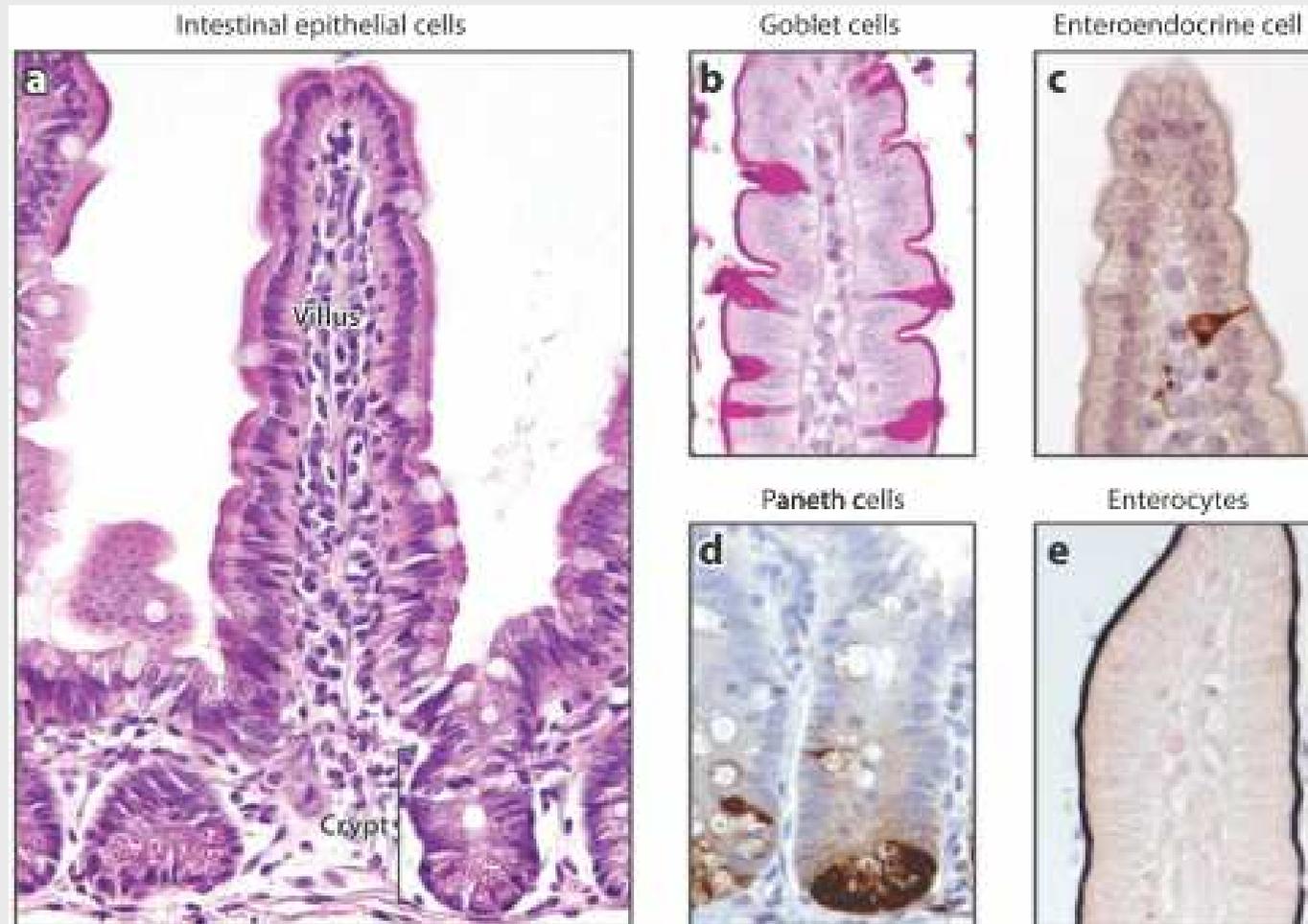
Organizzazione istologica del GE



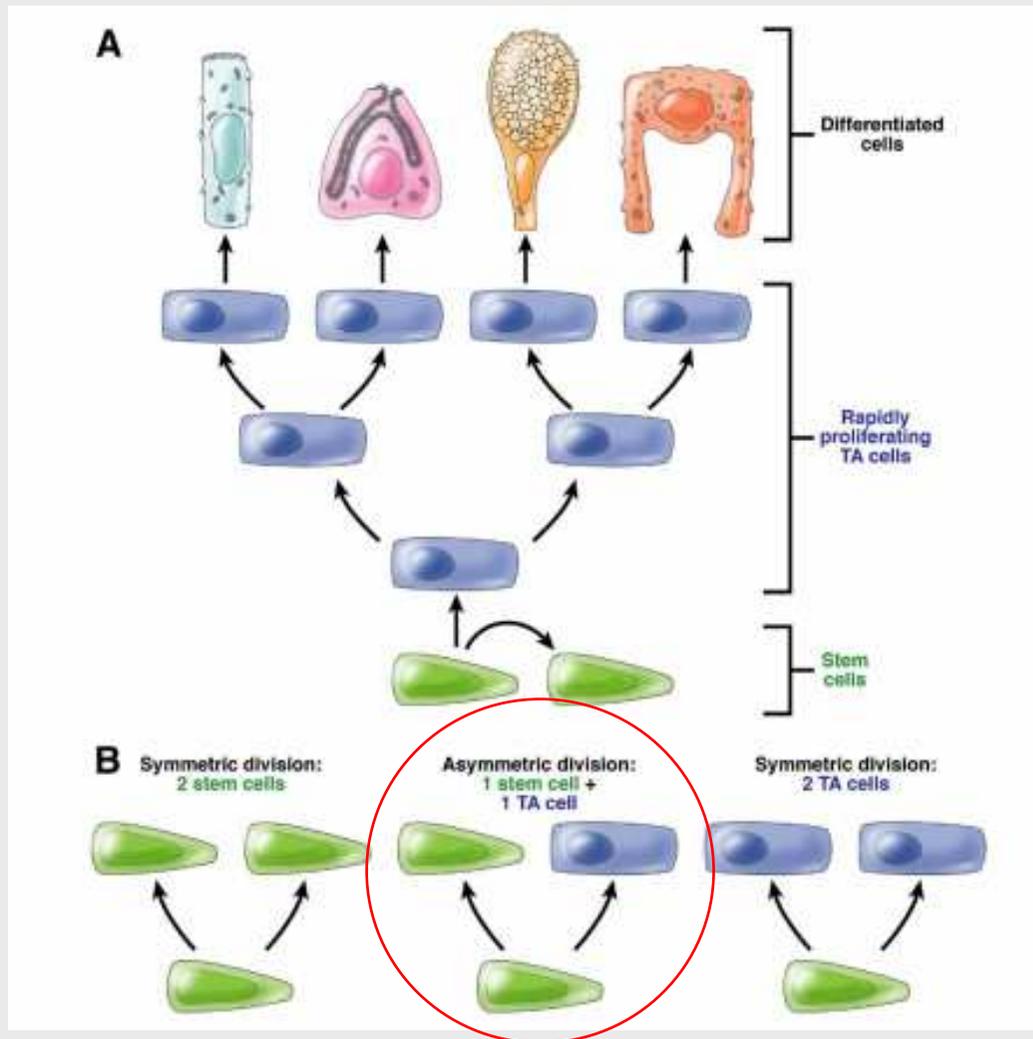
Cellule staminali dell'apparato GI



Epitelio intestinale: 4 popolazioni di cellule localizzate in zone precise



Un'unica cellula progenitrice per i diversi tipi di cellula dell'epit intestinale



Differenziamento



Cellule Transit-Amplifying



(4-5 divisioni)

Progenitori/cellule staminali adulte



Divisione asimmetrica

Epitelio intestinale: 4 popolazioni di cellule

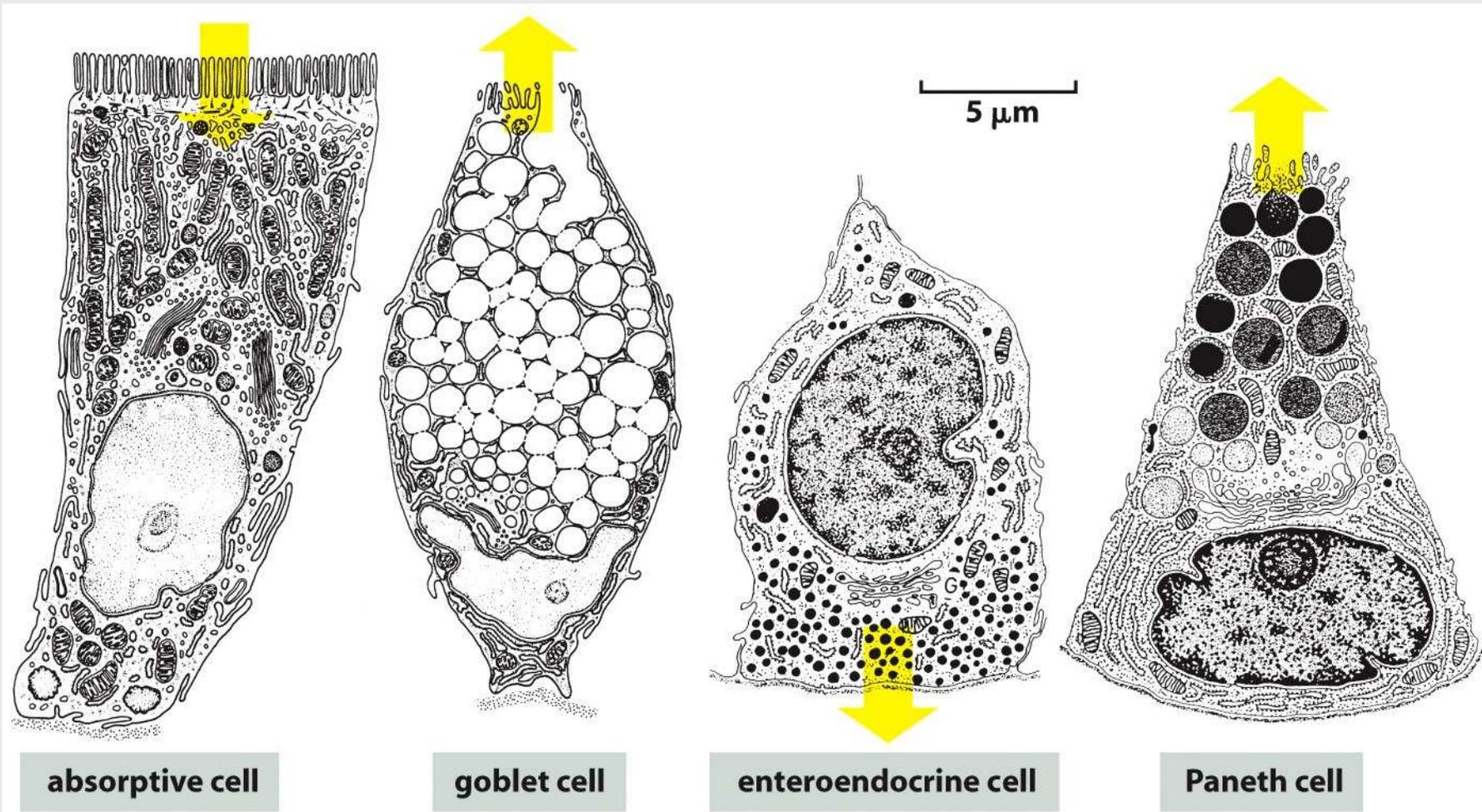
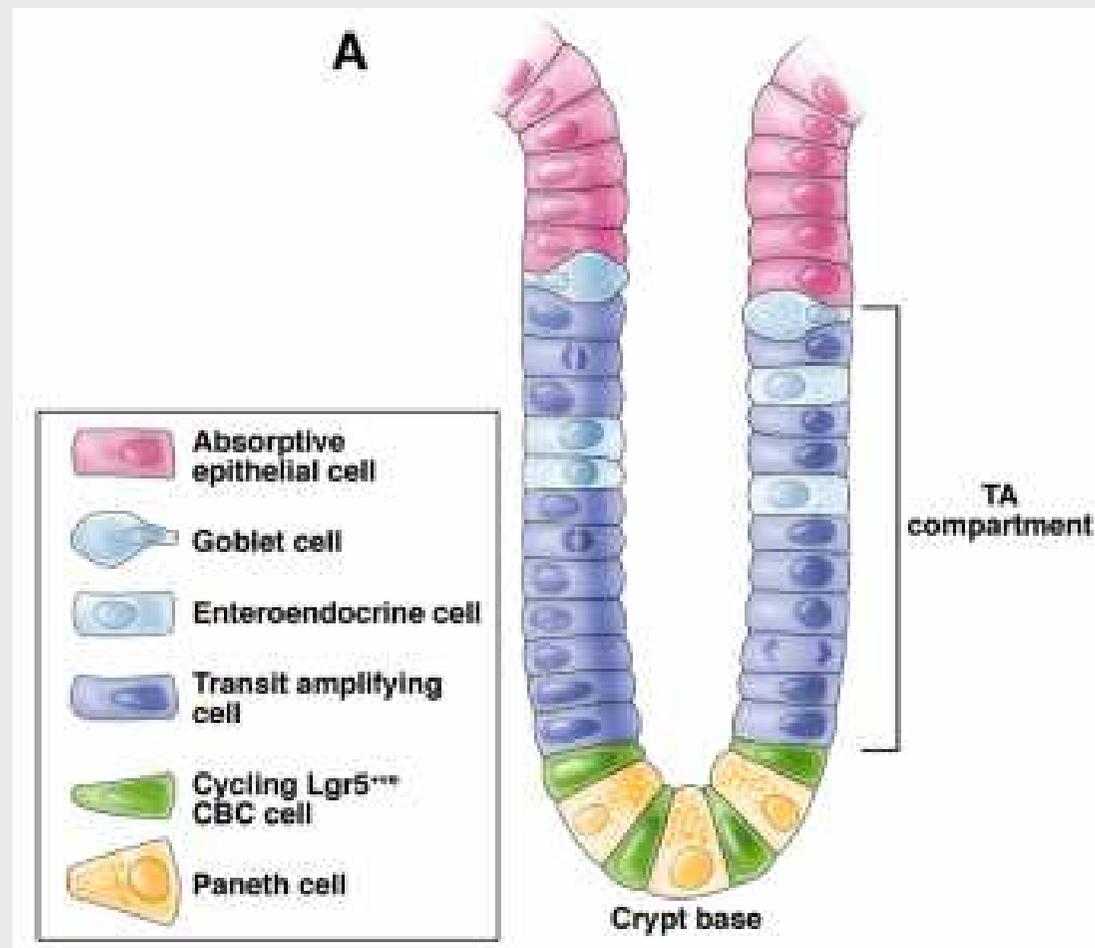
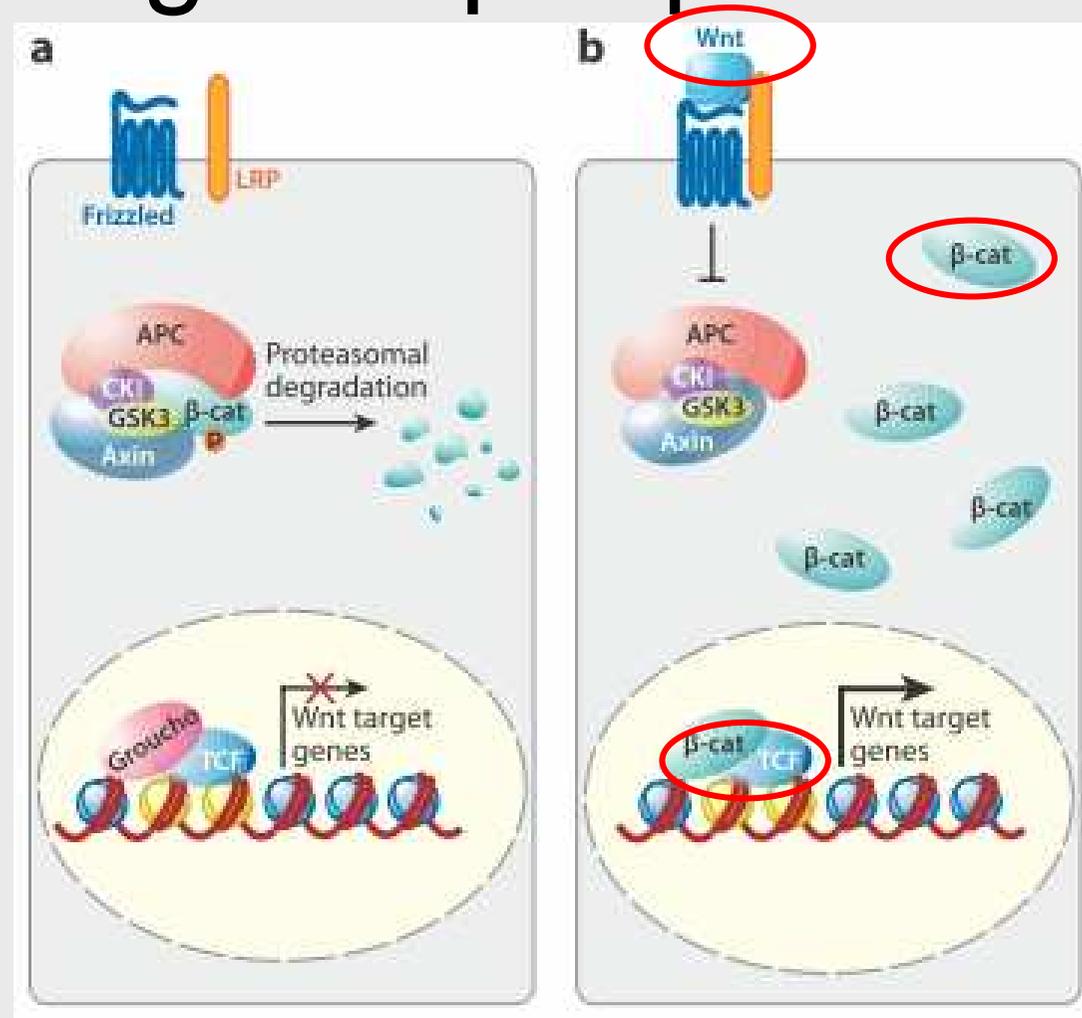


Figure 23-22 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Intestino: cripta del Lieberkhun



Wnt segnala per proliferazione



Wnt → β-catenin → TCF → CELL PROLIFERATION
(inibendo a uno di questi livelli: NO proliferation)

Wnt attivo → proliferazione
incontrollata (adenoma)



Colorazione per β -catenin (se troppa, è anche nel citoplasma)

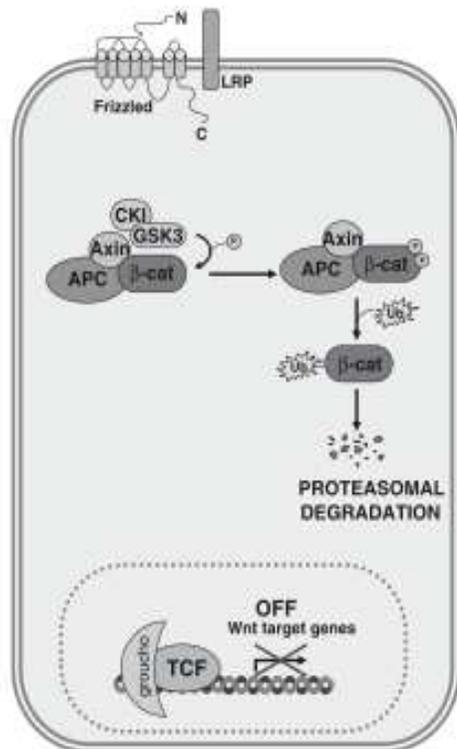
Attivazione/blocco della via di Wnt (I)

fisiologicam inattiva

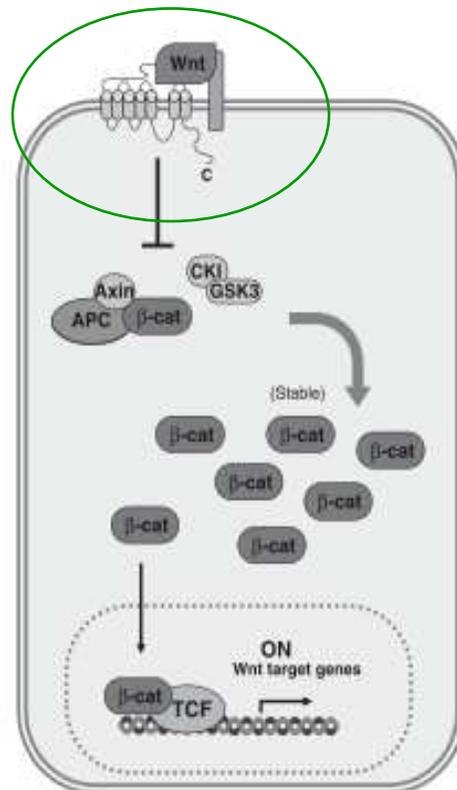
fisiologicam attivata
dal ligando

fisiologicam inibita

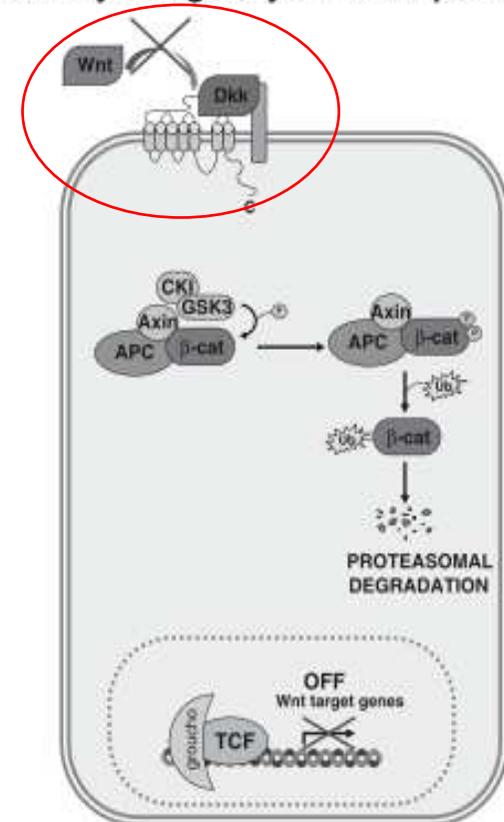
A. Physiologically inactivated pathway



B. Physiologically activated pathway



C. Physiologically inhibited pathway



In situazioni fisiologiche (normali):

APC --|β-catenin → TCF → NO CELL PROLIFERATION

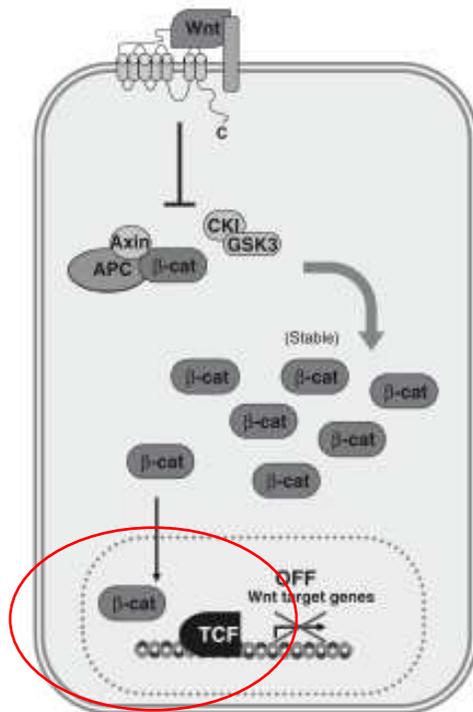
Attivazione/blocco della via di Wnt (II)

costitutivam inattiva
TCF non funzionante

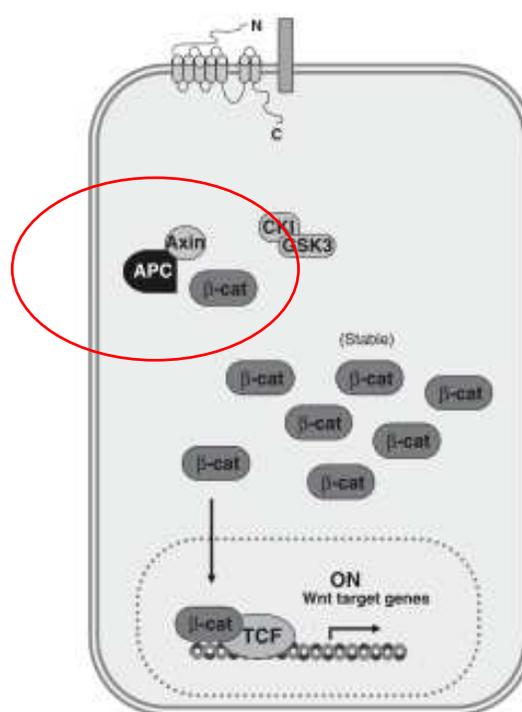
costitutivam attivata
APC non funzionante

costitutivam attivata
 β -catenina mutata

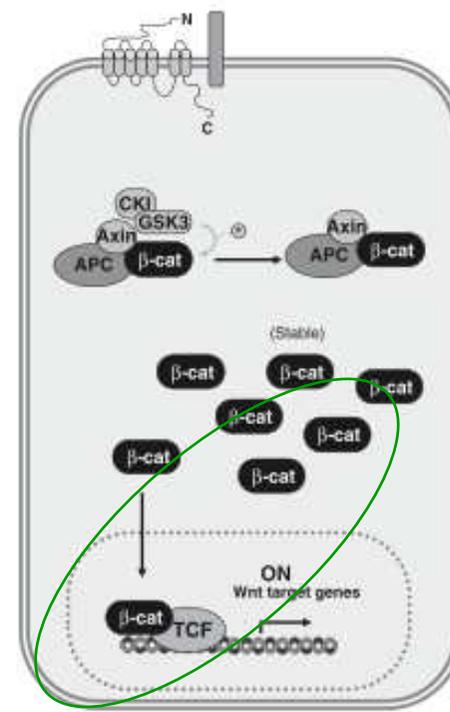
**D. Constitutively inactivated pathway
truncated TCF**



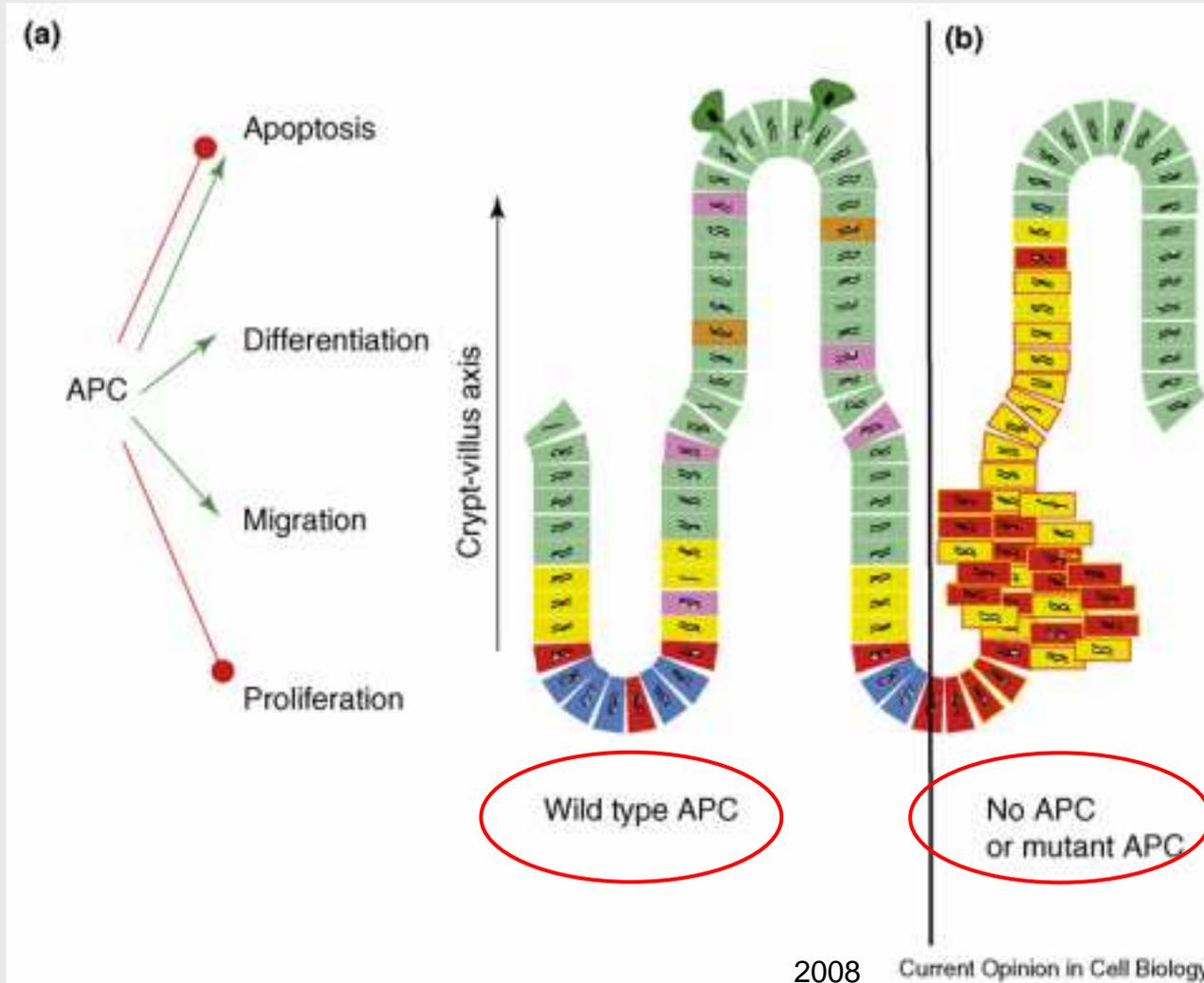
**E. Constitutively activated pathway
truncated APC**



**F. Constitutively activated pathway
oncogenic β -catenin**



Ruoli multipli di APC



- Proliferazione
- Mancano cellule secretive nel villo

Alla ricerca dell'ipotetica cellula staminale dell'intestino

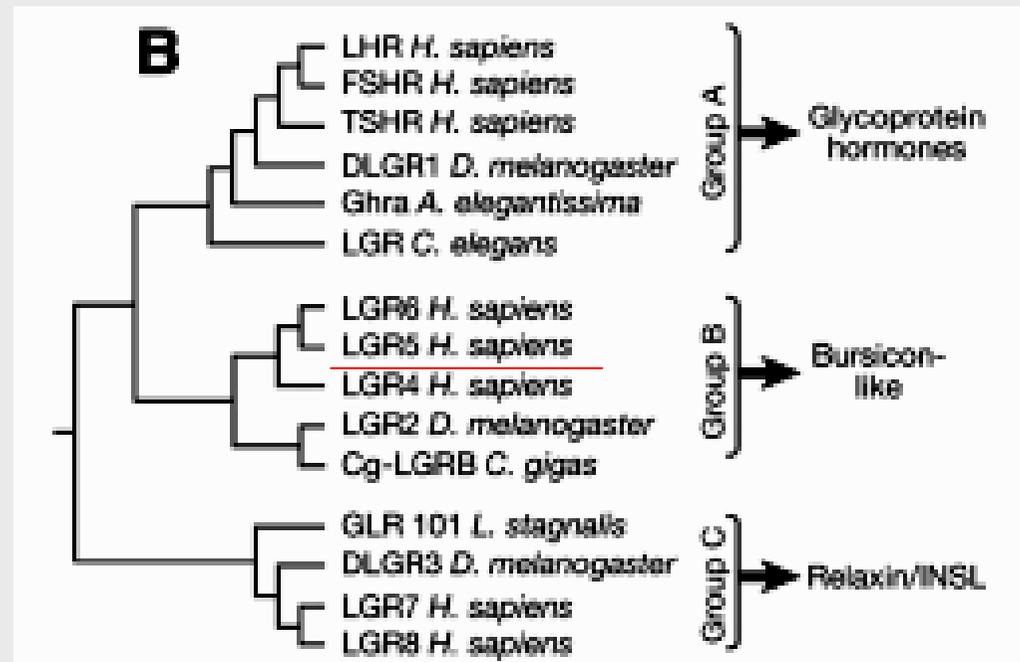
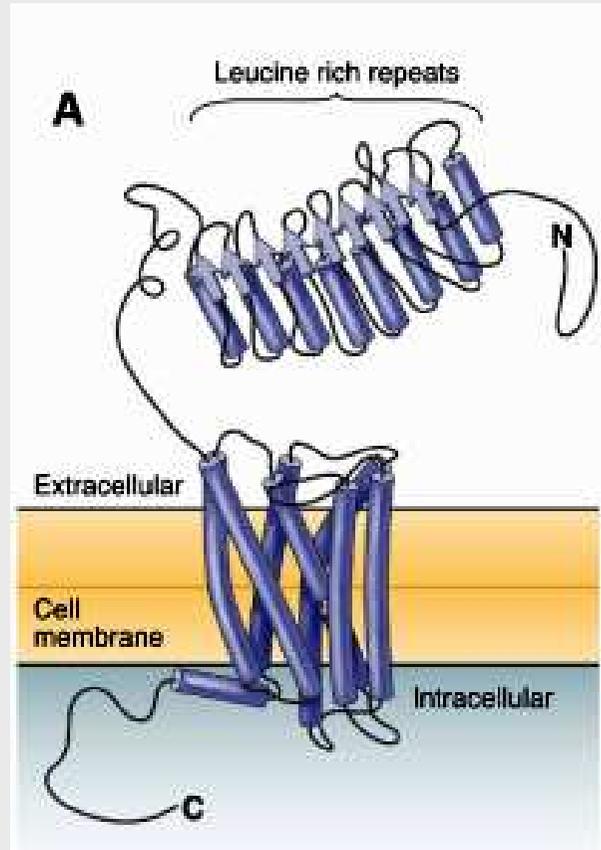
- Cellula +4 rispetto al fondo
- c/o Paneth
- Estremamente sensibile alla radiazione
- mantiene marker per DNA (cicla poco e in ogni caso: divisione asimmetrica)
- → **CBC = crypt base columnar**

Problema

- Come identificare stem cell per poi seguirne il destino?
- Per ora non ci sono marcatori specifici
- → marcatura genetica (mutagenesi chimica) è problematica
- → strategia basata su caratteristiche della cellula staminale: **proliferazione, localizzazione**

- Cercati i geni attivi della via di Wnt, con espressione localizzata al fondo della cripta con cellule in proliferazione o in tumori dell'intestino (cellule in proliferazione) (ibridazione in situ)
- Trovato **Lgr5**: un gene bersaglio della via Wnt-Tcf4

La famiglia dei recettori Lgr



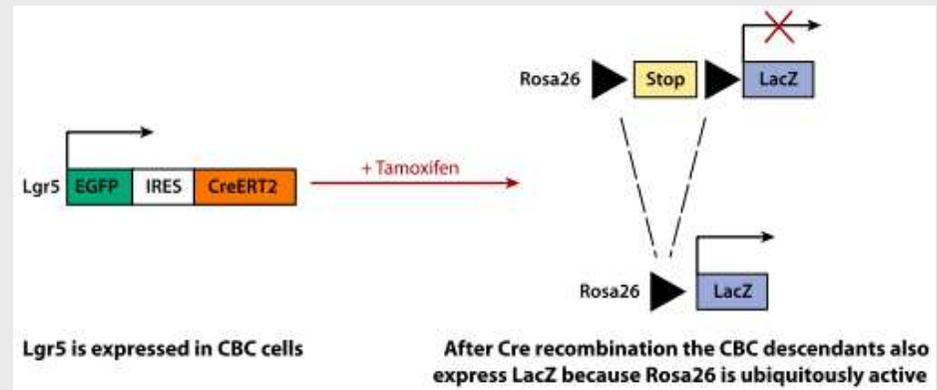
L'omologo di Lgr5/Gpr49 nella *Drosophila* è codificato da *ricketts*, è attivato da bursicon, neuroormone coinvolto in indurimento/iscurimento della cuticola (~ inibitore di BMP)

Espressione di Lgr5

- **Embrione normale**: soprattutto in lingua e mandibola
- **Topo KO**: letale dopo nascita (ingestione di aria, dilatazione tratto GI, niente latte nello stomaco; fusione lingua –pavimento cavità orale; maturazione accelerata delle cellule di Paneth)
- **Topo TG Lgr5-LacZ**:
- Embrione eterozigote: profilo di espressione dinamico e complesso
- Adulto: rare cellule in diversi organi, tra cui stomaco, intestino (c/o Paneth, proliferanti, con ciclo di 1 g)
- Buon **candidato come marcatore** di cellula staminale

In vivo lineage tracing

- Incrocio topi Lgr5-EGF-cre x R26RlacZ (ceppo reporter)

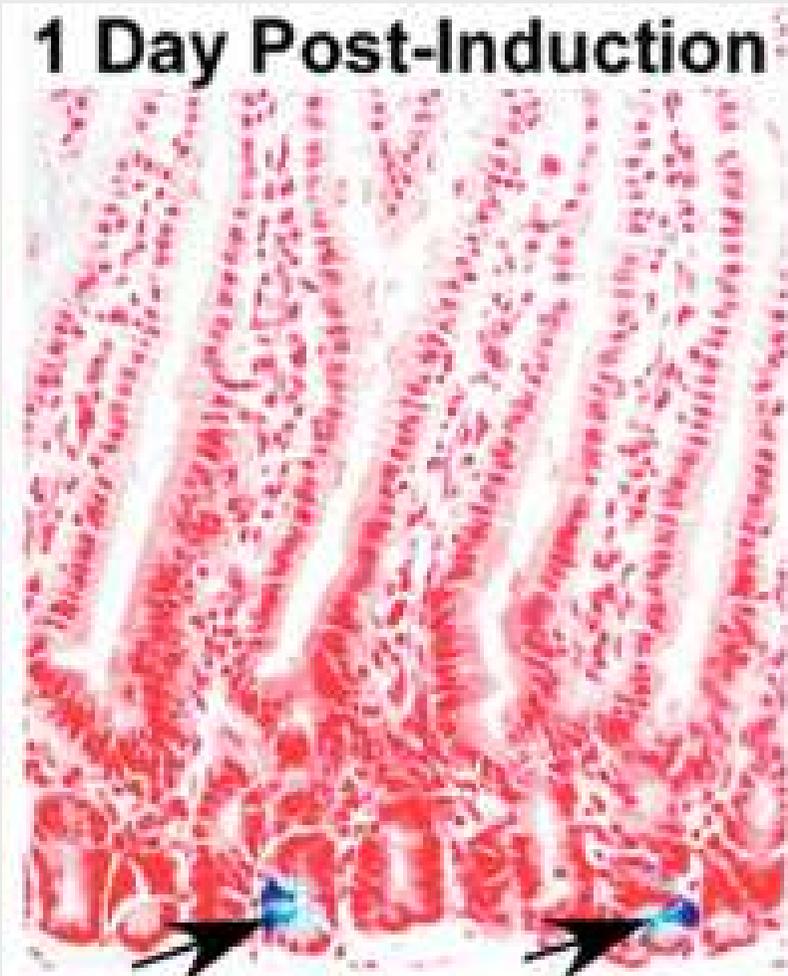


- Inoculando bassa dose di tamoxifene

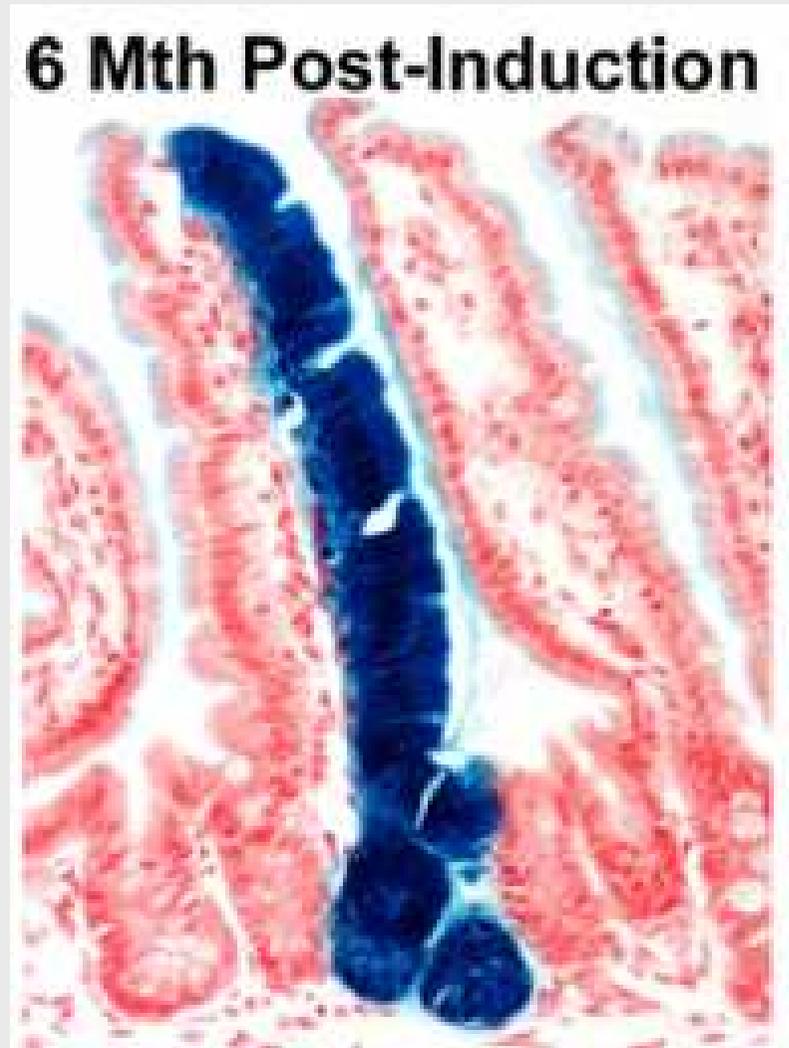
in alcune cellule viene indotta l'espressione dell'enzima cre (ricombinasi) sotto controllo del promotore di Lgr5

- → attivazione del gene reporter (segnale blu) esaminata a giorni successivi
- **Vantaggi:** il marcatore genetico è visualizzabile per sempre, non sono necessarie manipolazioni
- Studi di acquisto o perdita di funzione (Gain or loss of function)

1 Day Post-Induction



6 Mth Post-Induction



Cellule Lgr5+ (duodeno)

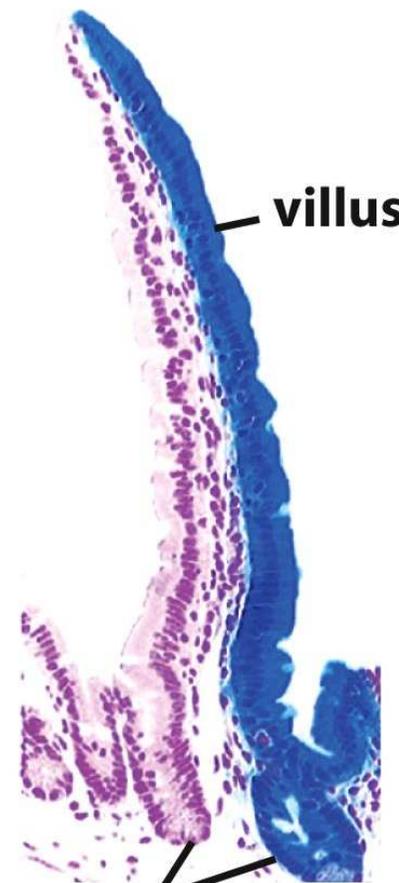


(A)



1 mm

(B)



villus

crypts

50 μ m

Figure 23-25 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

La via di Wnt (gradiente) per proliferazione

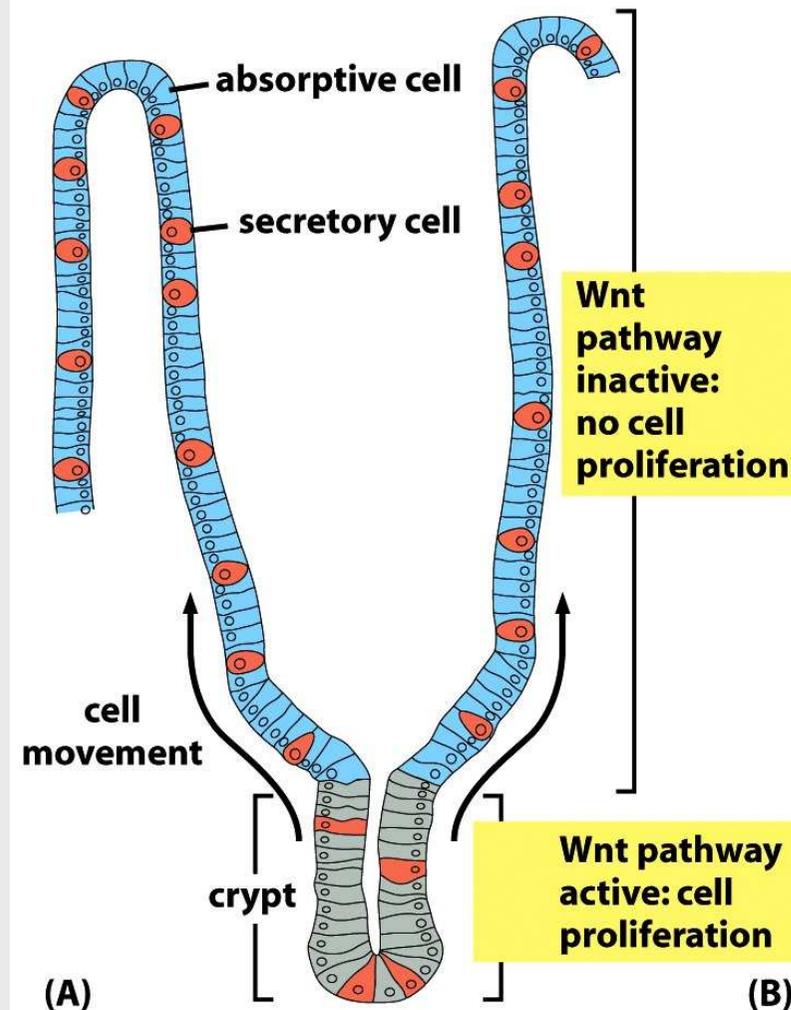
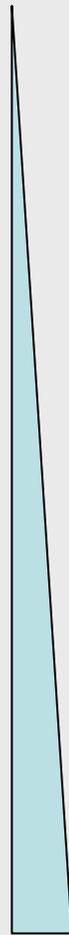
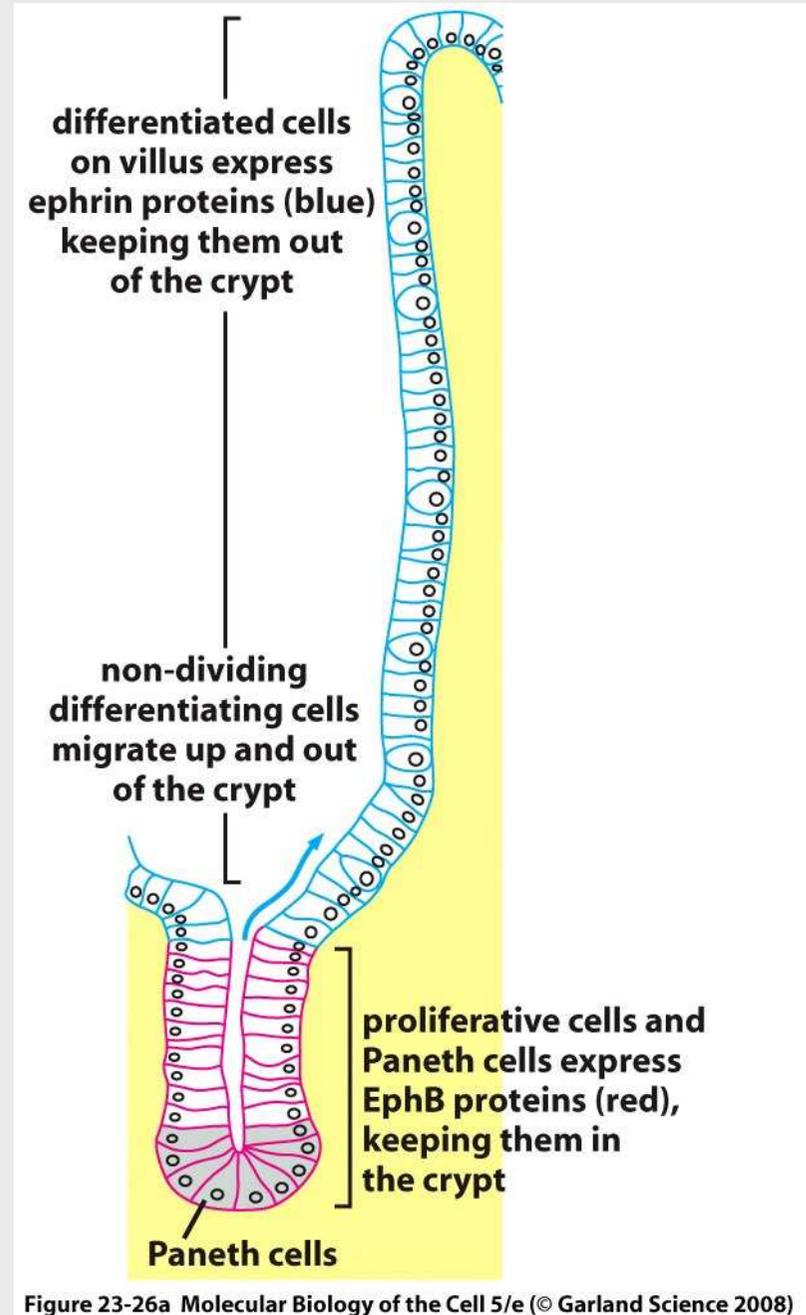


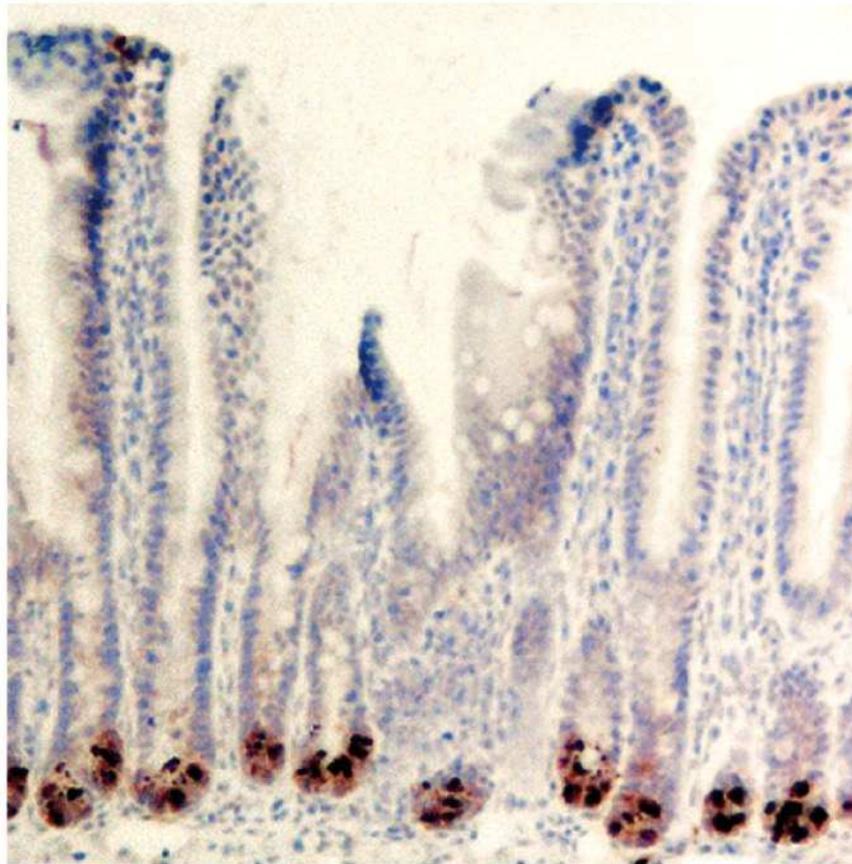
Figure 23-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

La via EphB/efrina controlla la segregazione cripta/villo

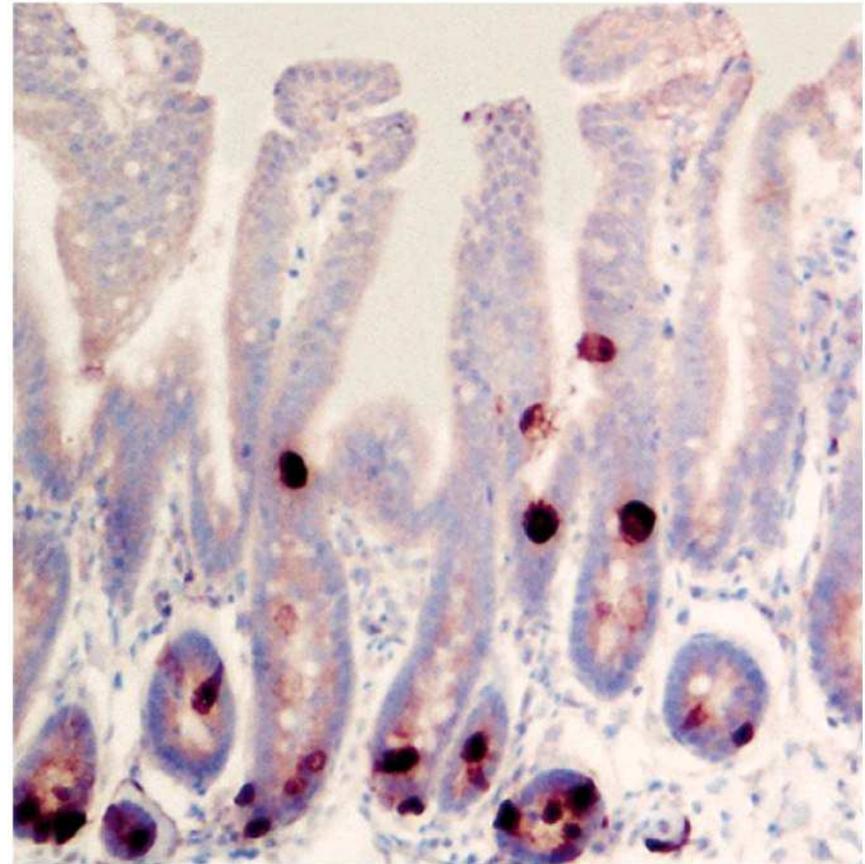
L'espressione di EphB
mantiene le cellule nella cripta



Cellule di Paneth EphB^{-/-} migrano nel villo



wild type



EphB mutant

200 μ m

Diversi segnali
sono responsabili
del mantenimento
dei due
microambienti:
cripta/villo

Wnt/Hh → BMP4 --| Wnt/Hh
 (cripta) (villo)

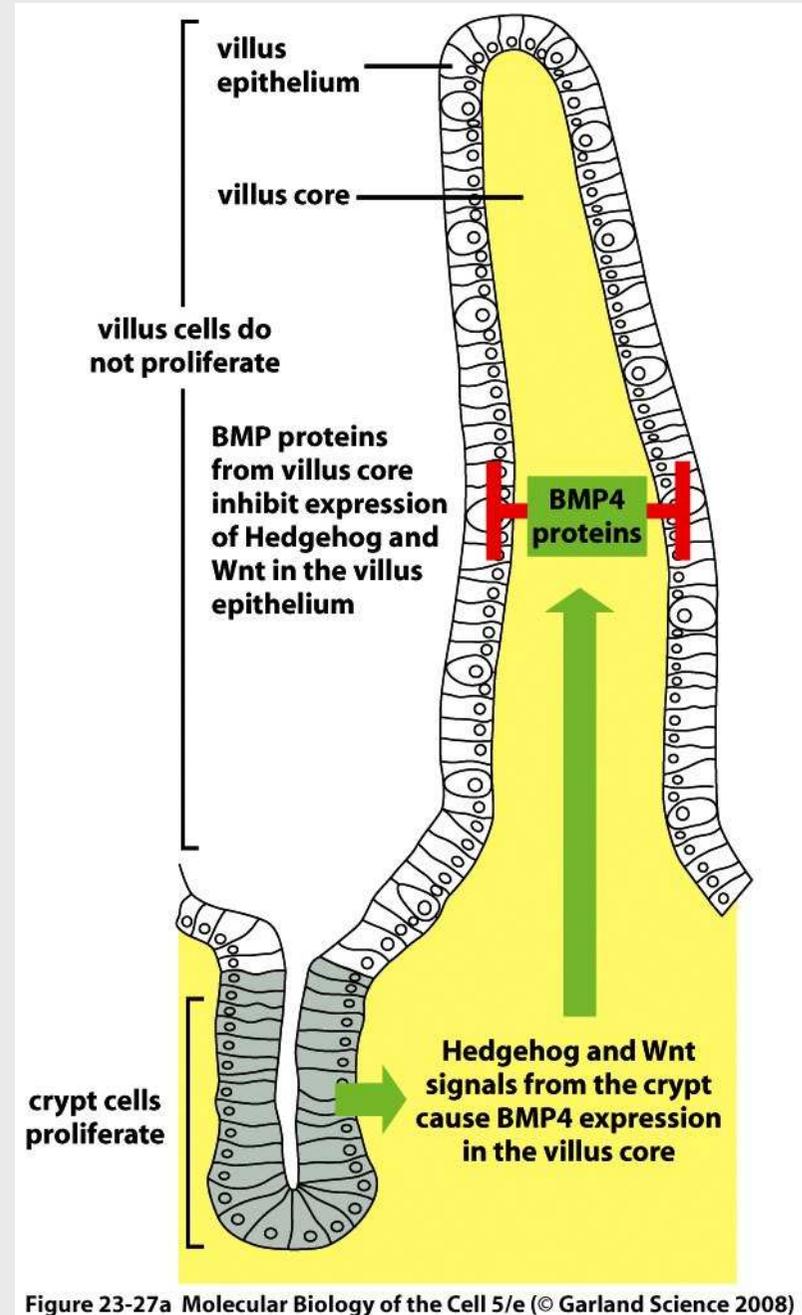
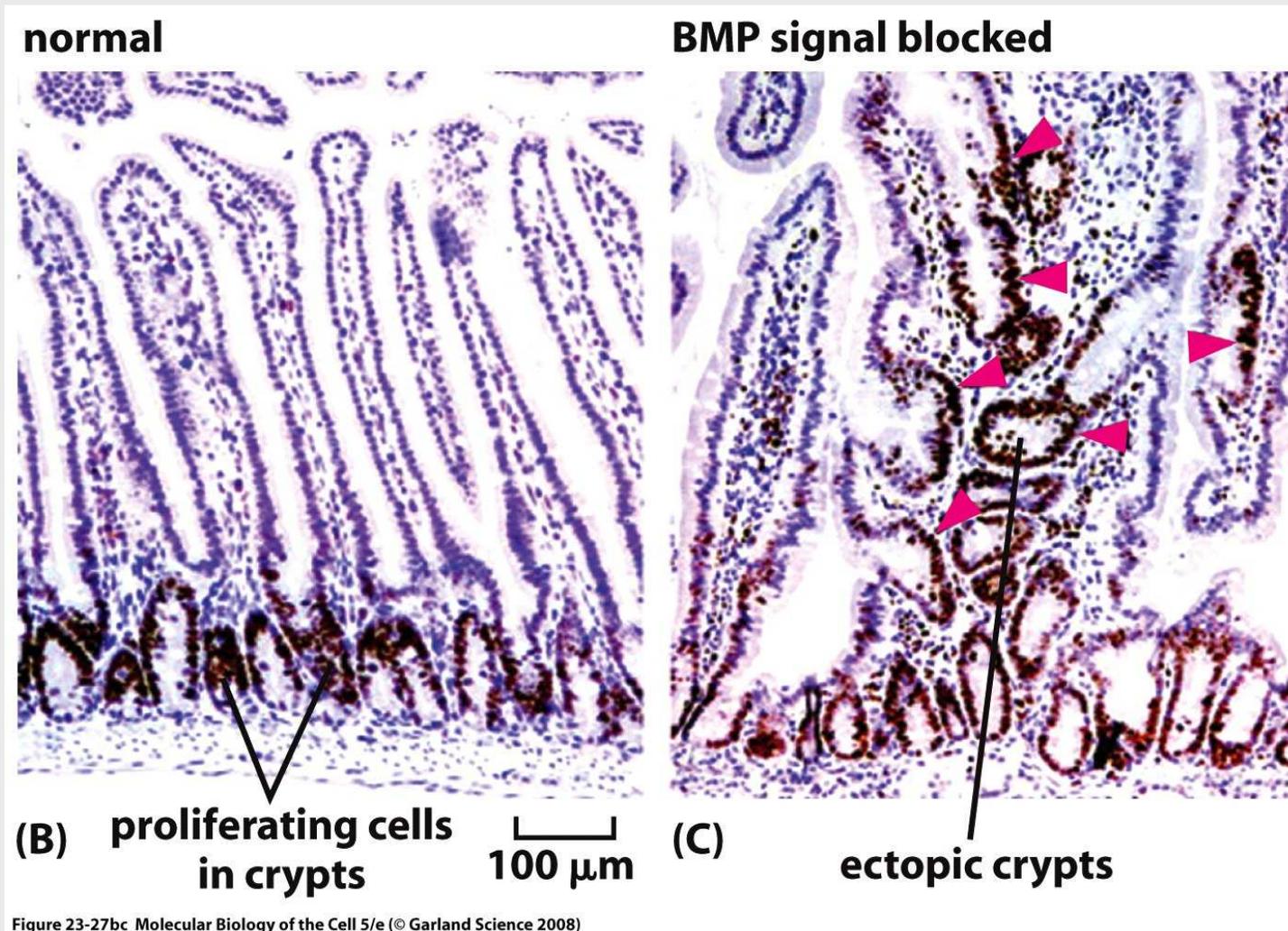


Figure 23-27a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

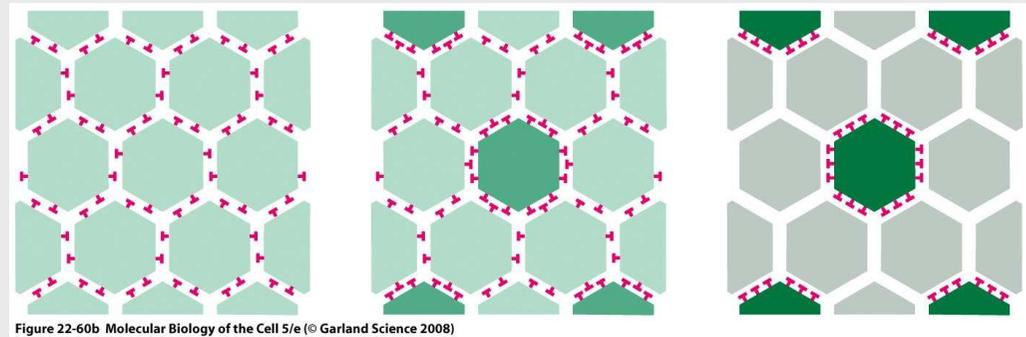
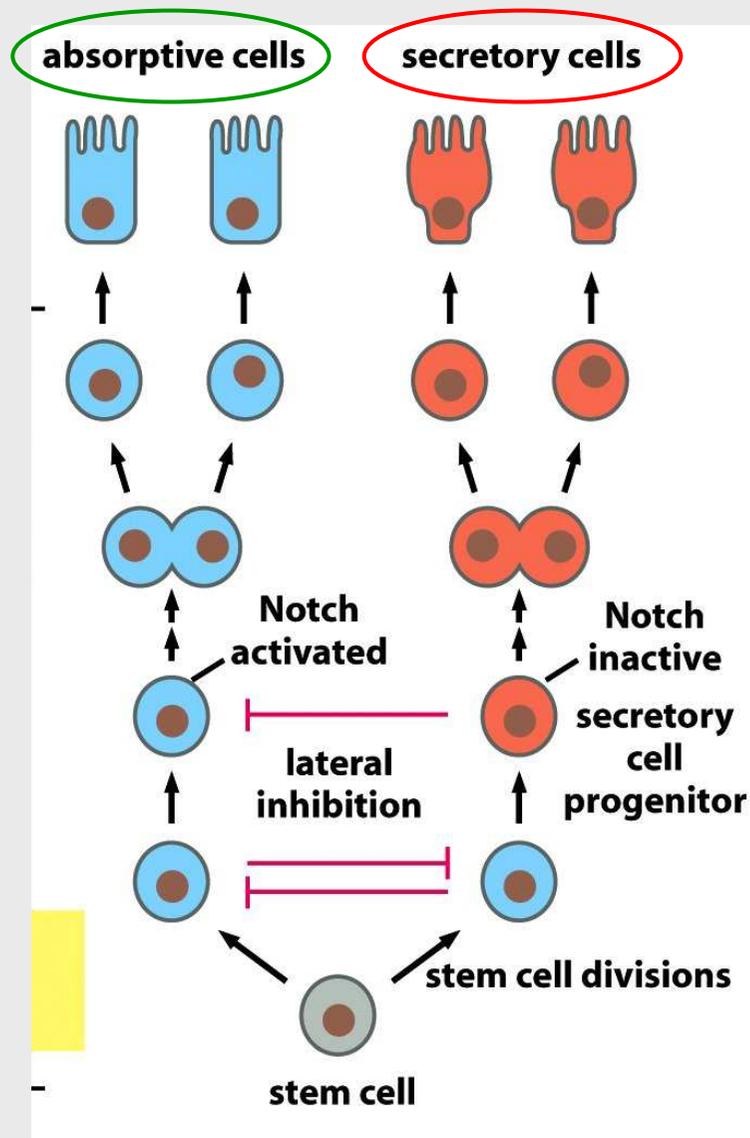
Interazione per equilibrio cripta-villo

- Mesenchima del villo (BMP → Smad)
→ villo e --| cripte (proliferazione)
- Noggin (inibitore di BMP) → cripte ectopiche

Manca di espressione di BMP
→ espressione ectopica di cripte



Notch nella scelta del destino



Inizialmente tutte le cellule sono equivalenti

Quella insensibile al segnale mediato da Notch si specializza in cellula secretrici

Inibizione laterale seleziona le cellule secreeatrici (Notch/Delta)

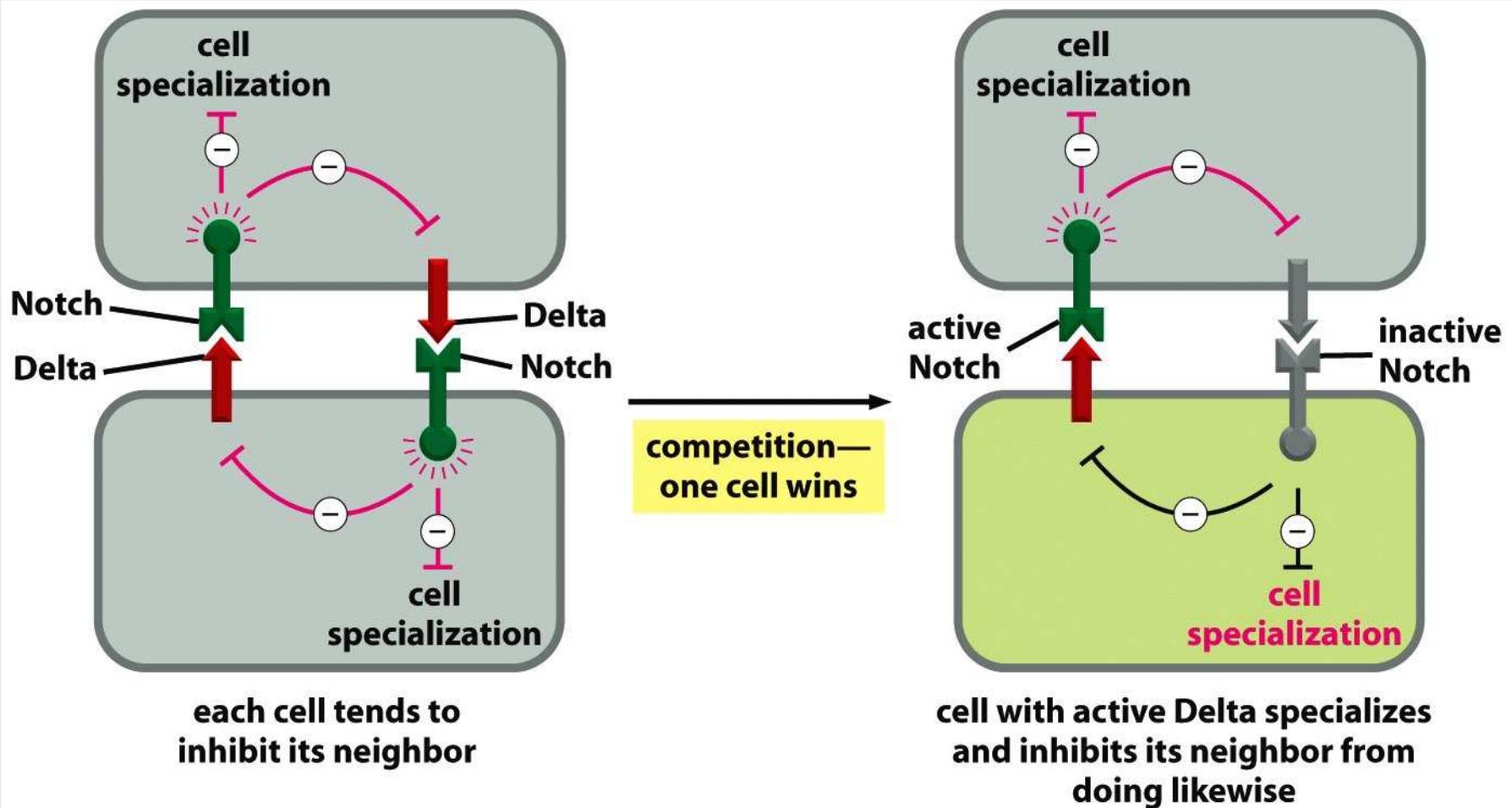
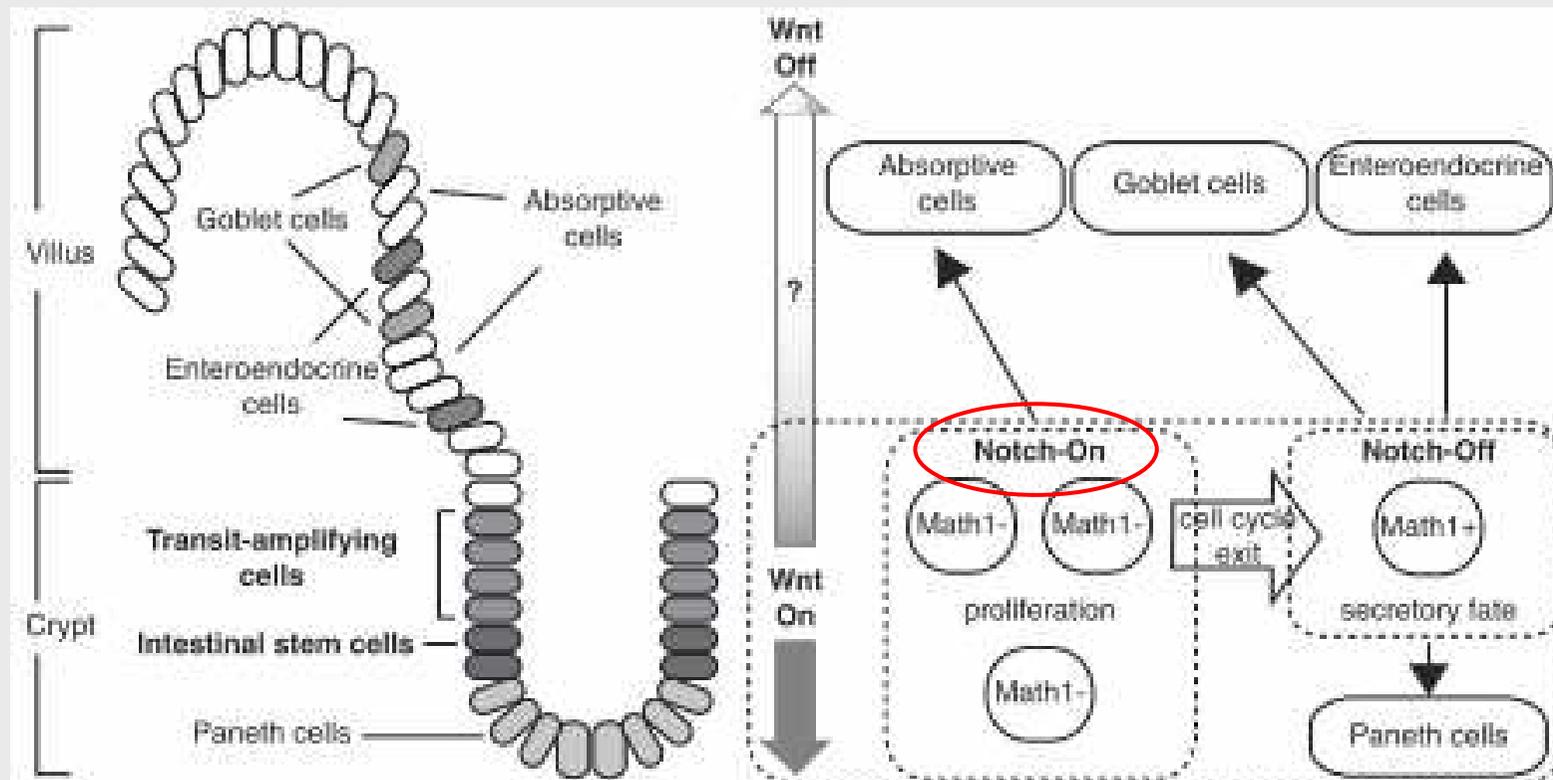


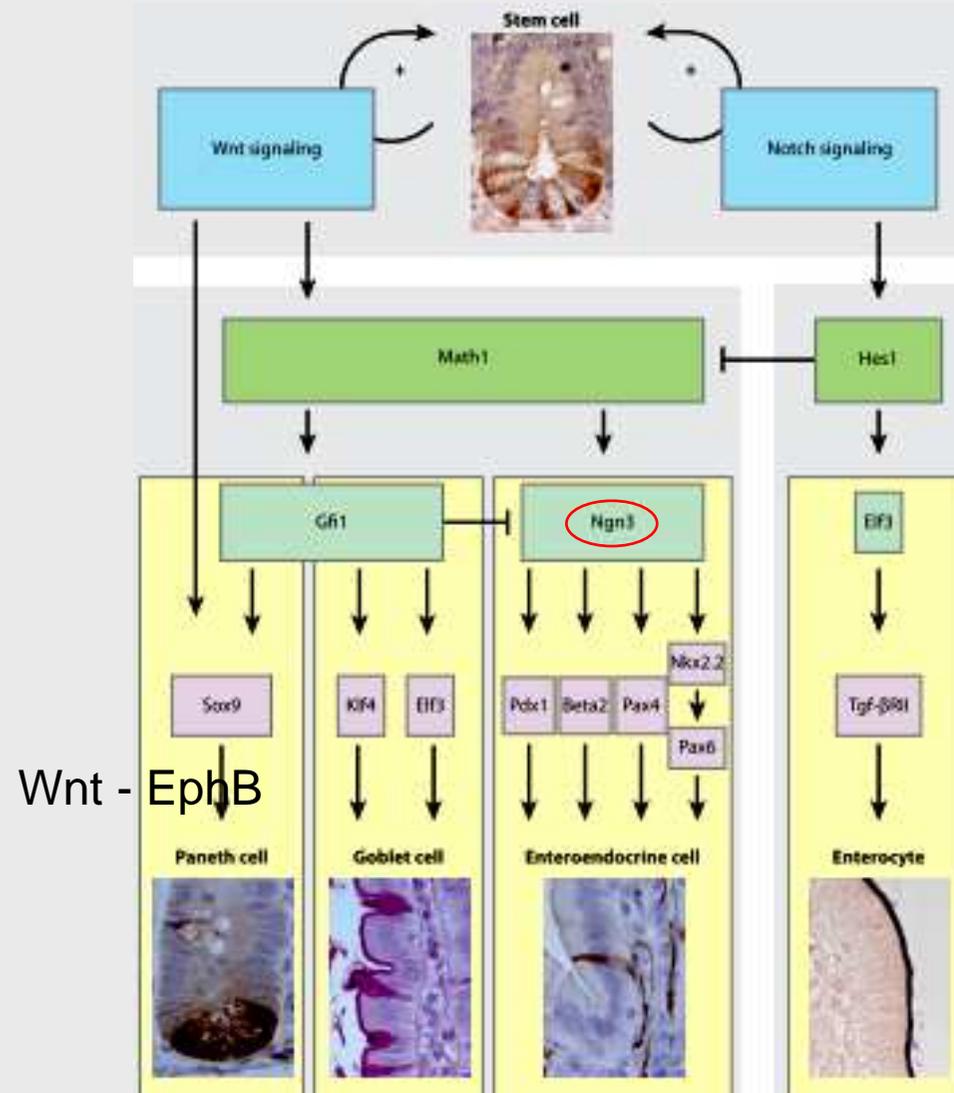
Figure 22-60a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Attivazione di Notch induce le cellule alla via assorbente



Wnt x diff & EphB x rilocalizzare cellule del Paneth

Attivazione di Notch induce le cellule alla via assorbente



Ruolo di Notch

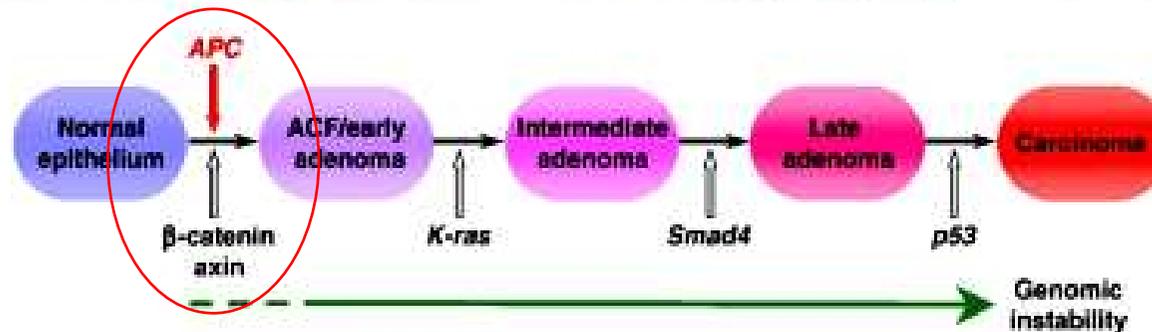
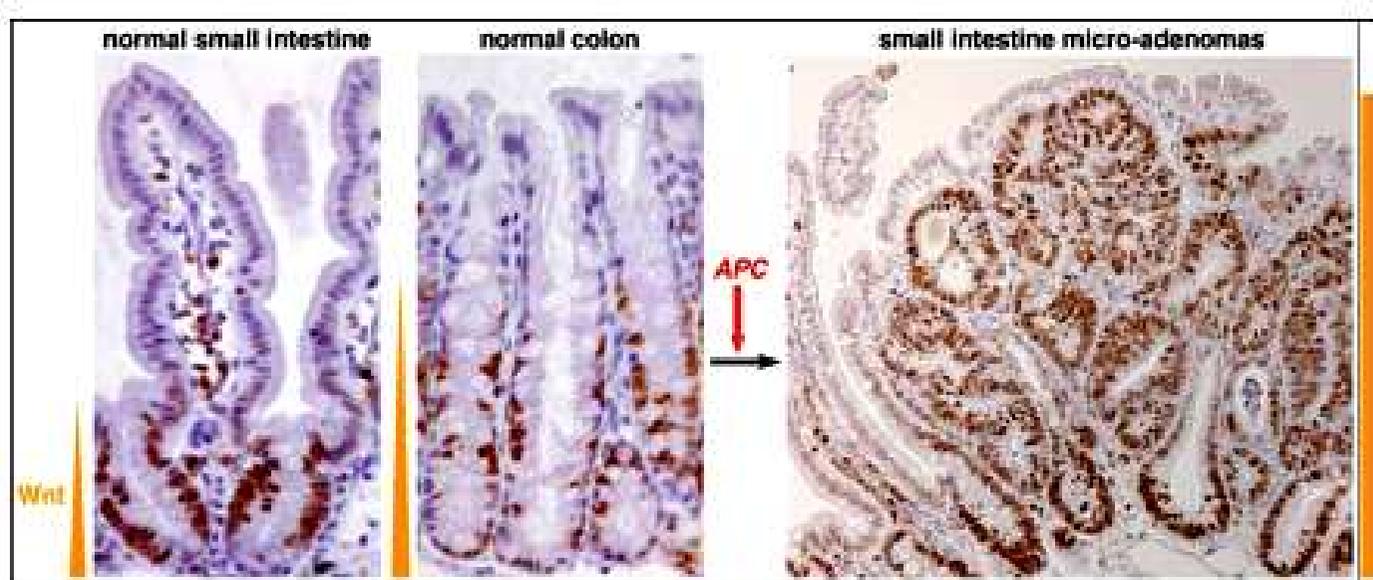
- Notch: mantiene in stato indifferenziato, proliferante
- Mutante condizionale Notch: continua a esser espresso nei nastri clonali di cellule
- --| Notch → cellula mucipare
- Notch* → << cellule mucipare

Secrezione $\overset{\text{Notch}^*}{\downarrow} \text{-----} \rightarrow$ Assorbimento

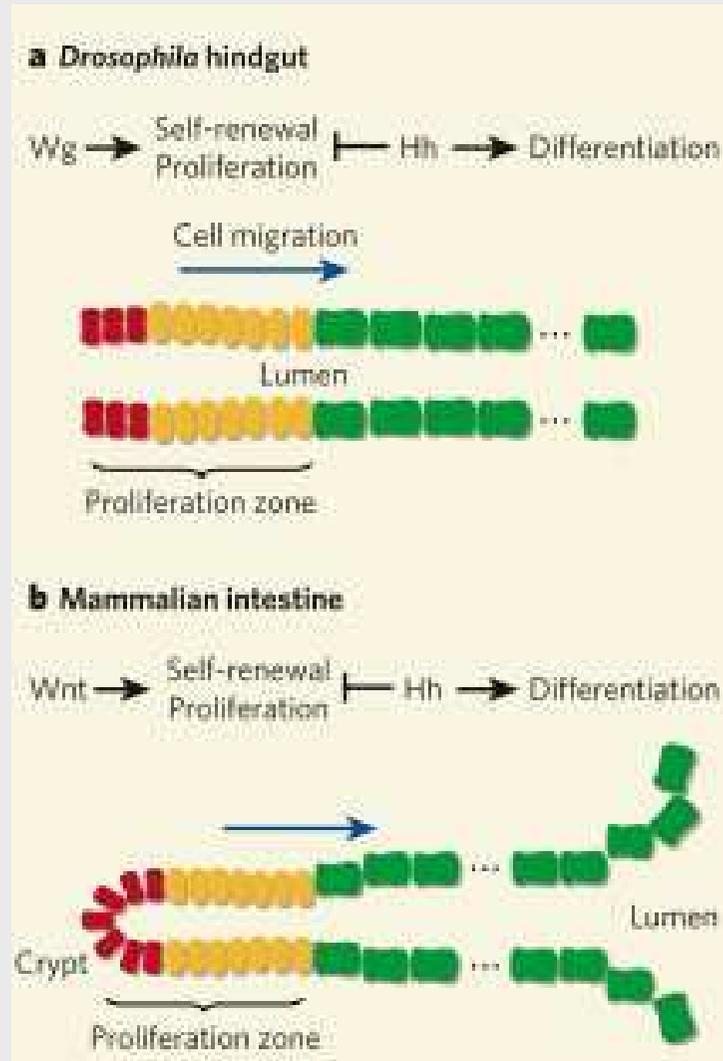
CRC (colorectal carcinoma)

- Via di **Wnt*** sregolata → adenoma
- Su questo altre mutazioni → carcinoma
- CSC = cancer stem cell, che inizia il tumore e deve essere annullata per poter debellare completamente la malattia

Attivazione di Wnt è il primo passo verso il carcinoma colon-rettale

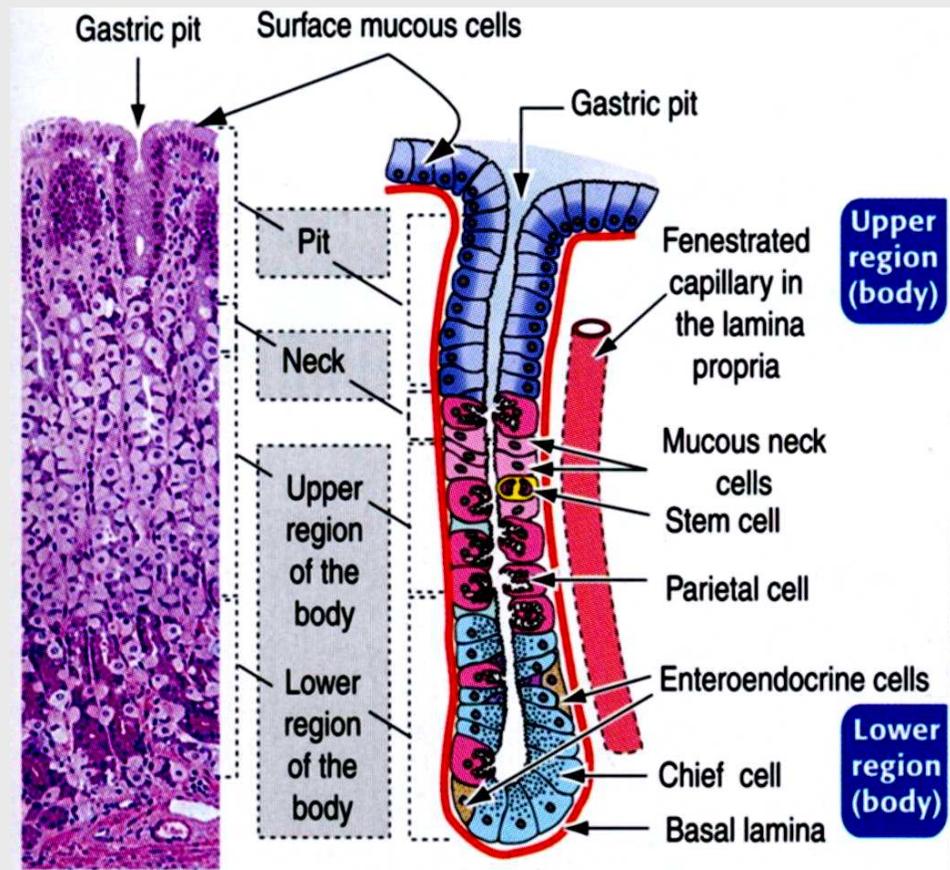
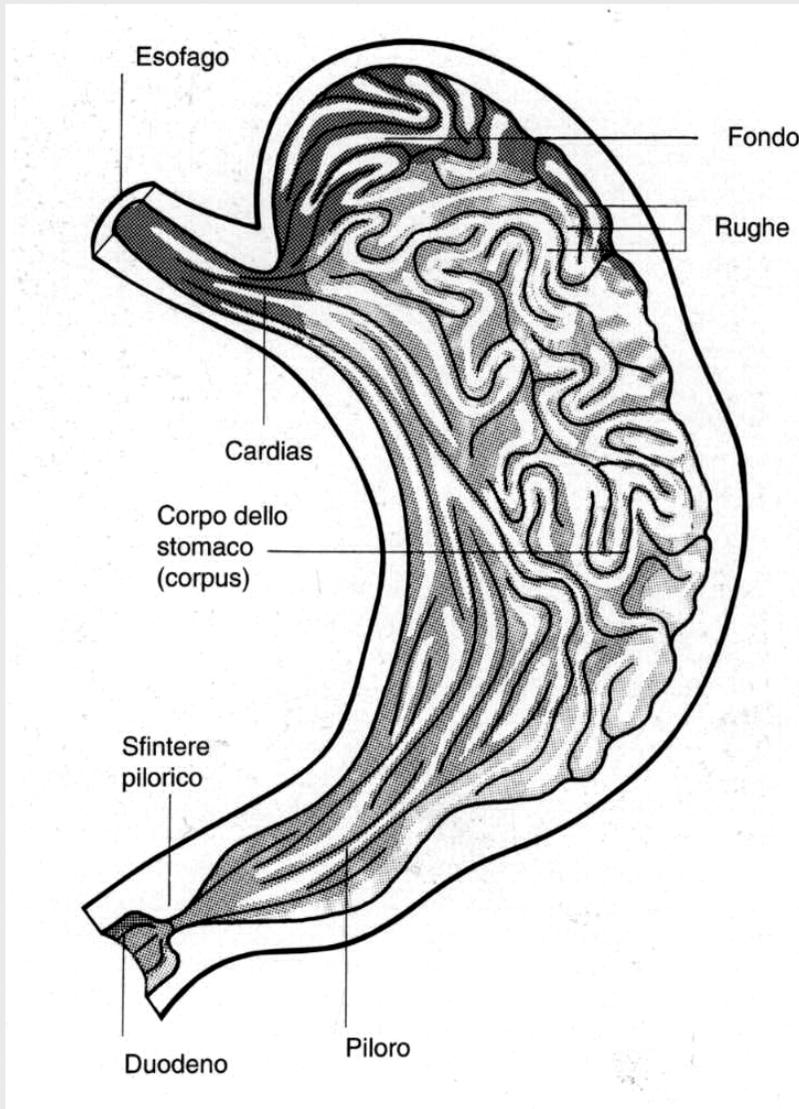


Sistema di segnalazione mantenuto nell'evoluzione



Nature, 2008;454-592-93

Struttura dello stomaco

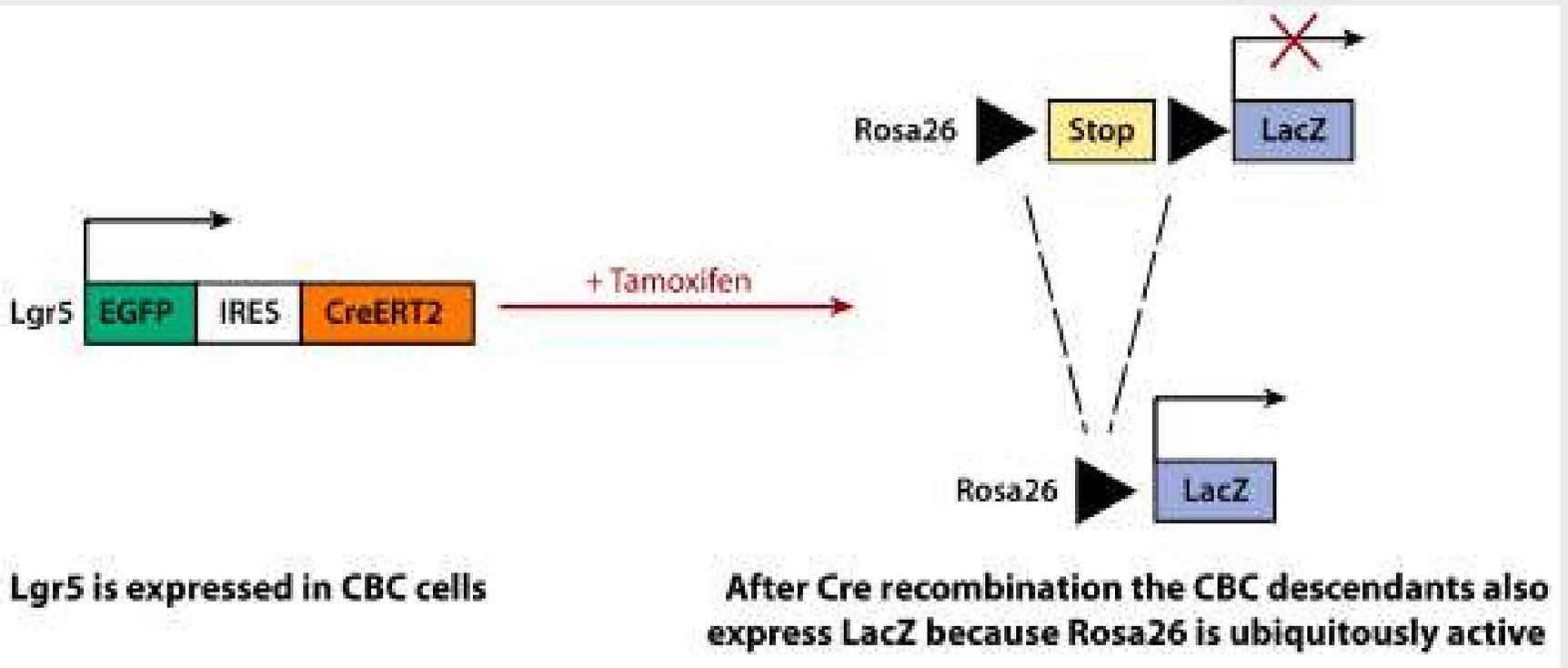


Cell Stem Cell 2010;6:25-36

Article

Lgr5^{+ve} Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro

Barker et al. (Olanda)

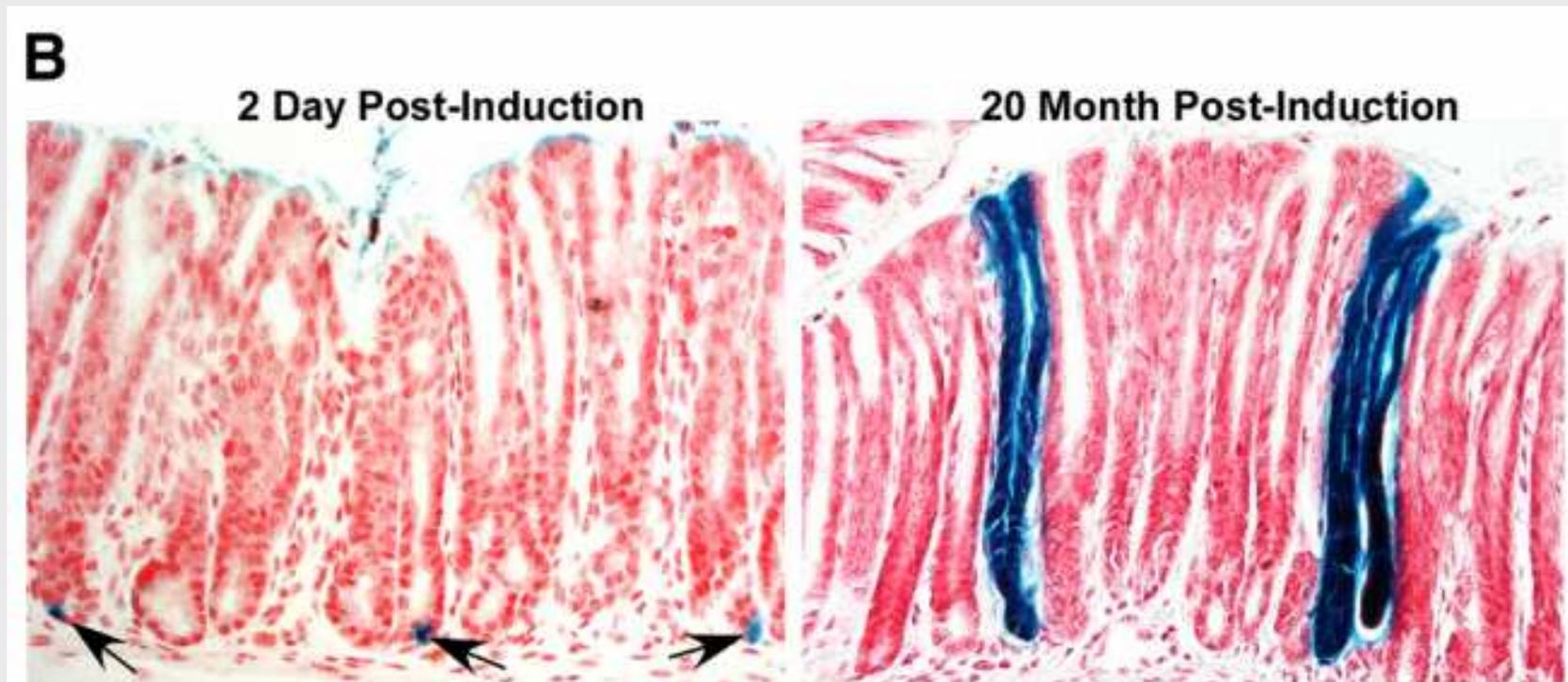


EGFP

In vivo lineage tracing

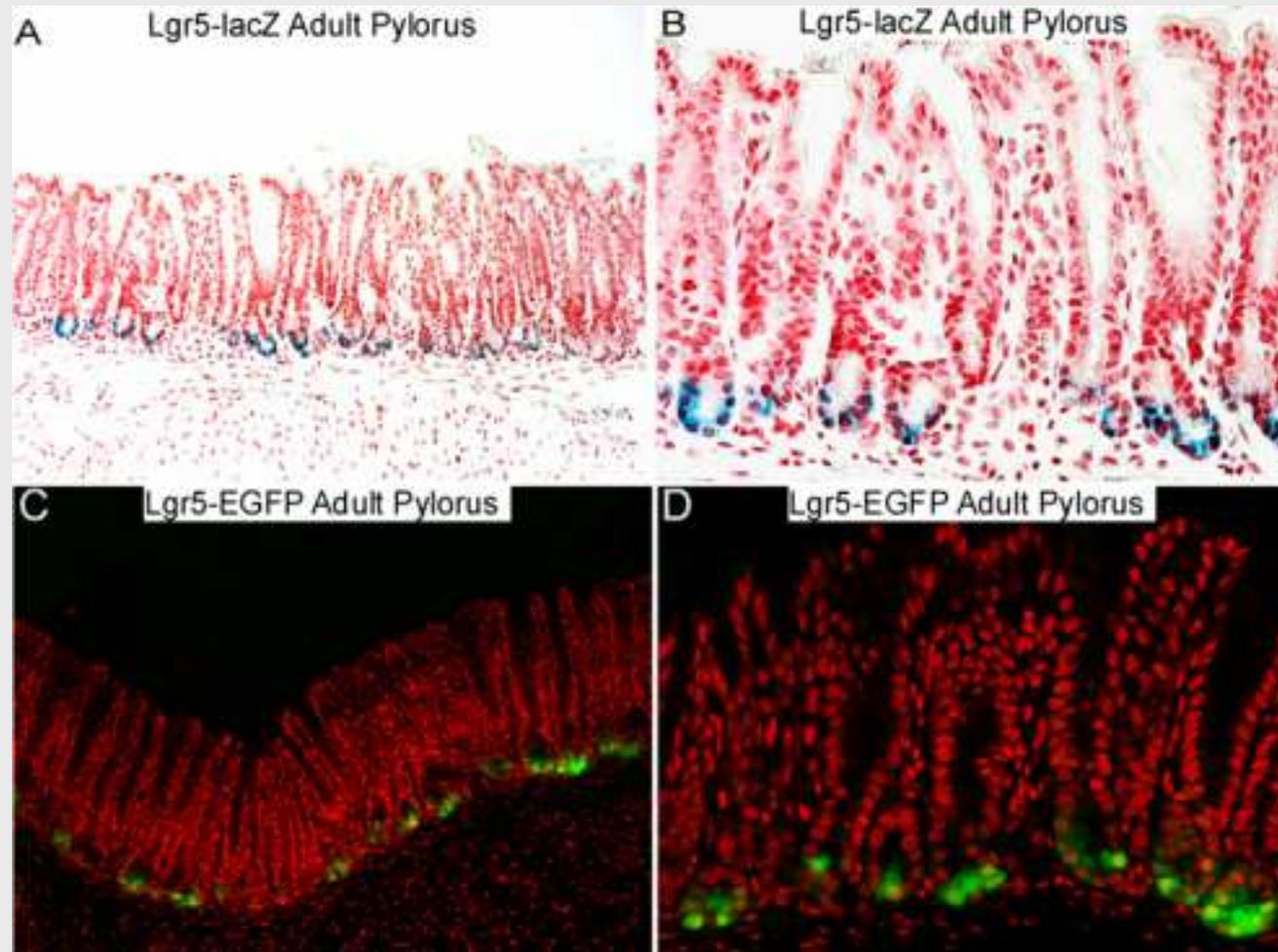
- Incrocio topi
- Lgr5-EGF-cre x R26RlacZ (ceppo reporter)
- Inoculando bassa dose di tamoxifene indotta espressione dell'enzima cre controllato da Lgr5
- → attivazione del gene reporter (segnale blu o fluorescente per GFP) esaminata a giorni successivi

Attivazione del gene reporter (segnale blu) esaminata a tempi successivi



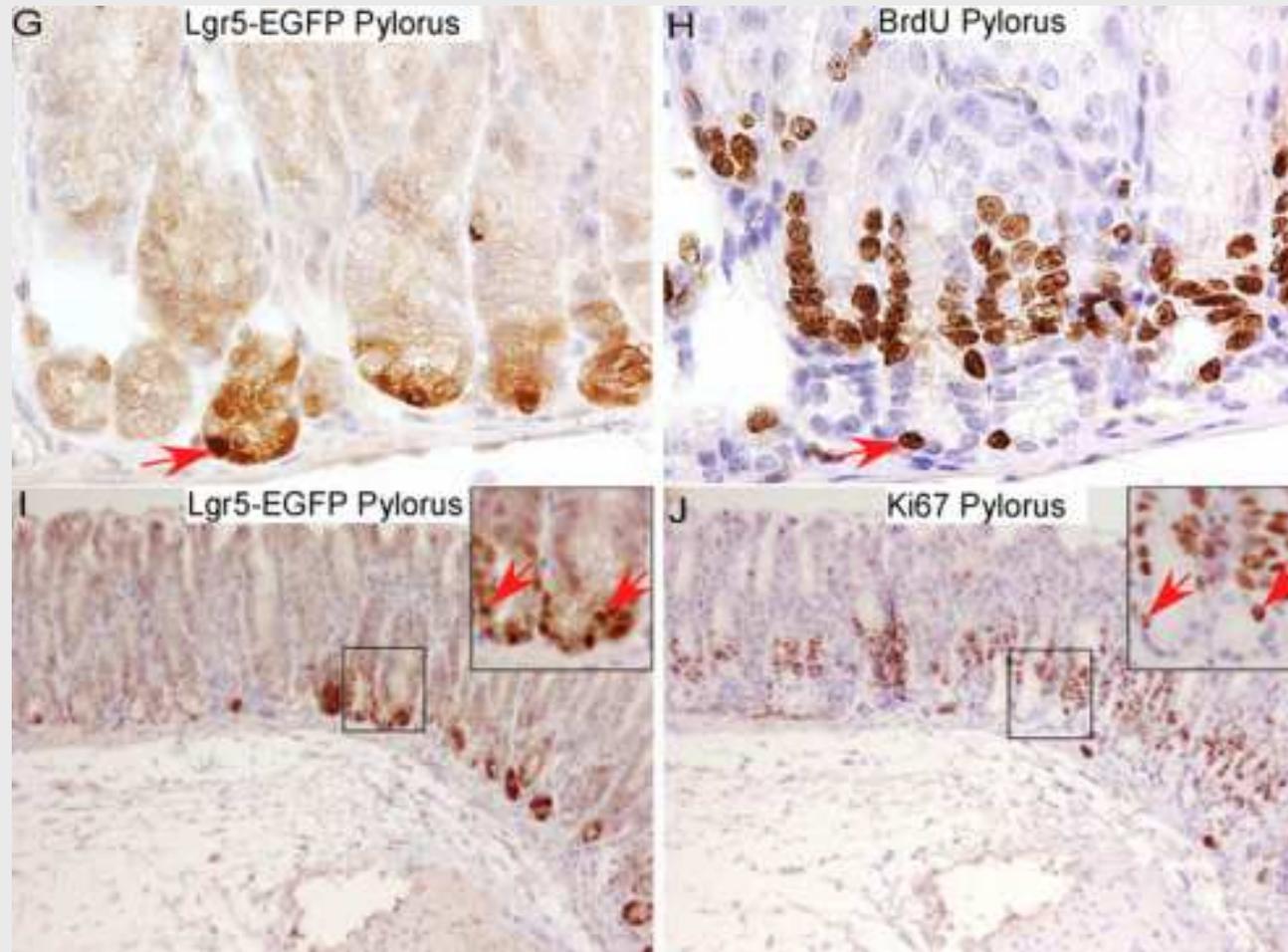
topo

Nell'adulto l'espressione di Lgr5 è ristretta alle base delle gh piloriche



stesso
risultato
x in situ

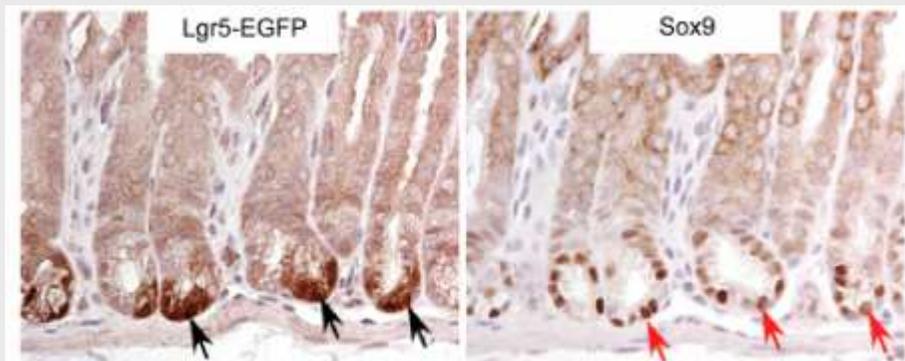
Solo alcune delle cellule che proliferano (Ki67+) sono anche Lgr5+ e viceversa



29% cell
EGFP+
sono
anche
Ki67+

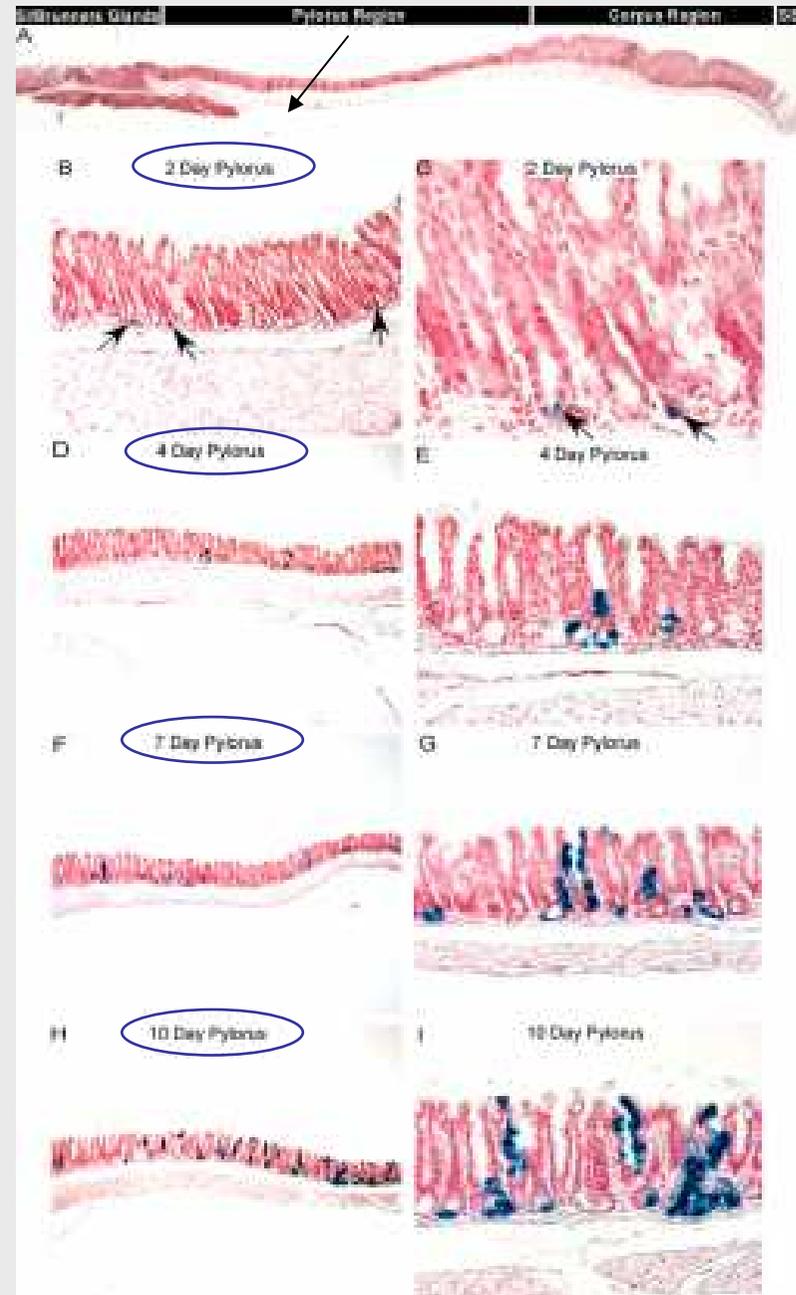
BrdU somministrato ai topi 2 h prima del sacrificio

- Poiché Wnt pathway: cercata espressione di un suo target: topi KI Axin-lacZ → OK
- Stimolato Wnt con suo ligando R-spondin (intraperitoneo) → 2gg → ucciso topo: alta espressione Lgr5-lacZ



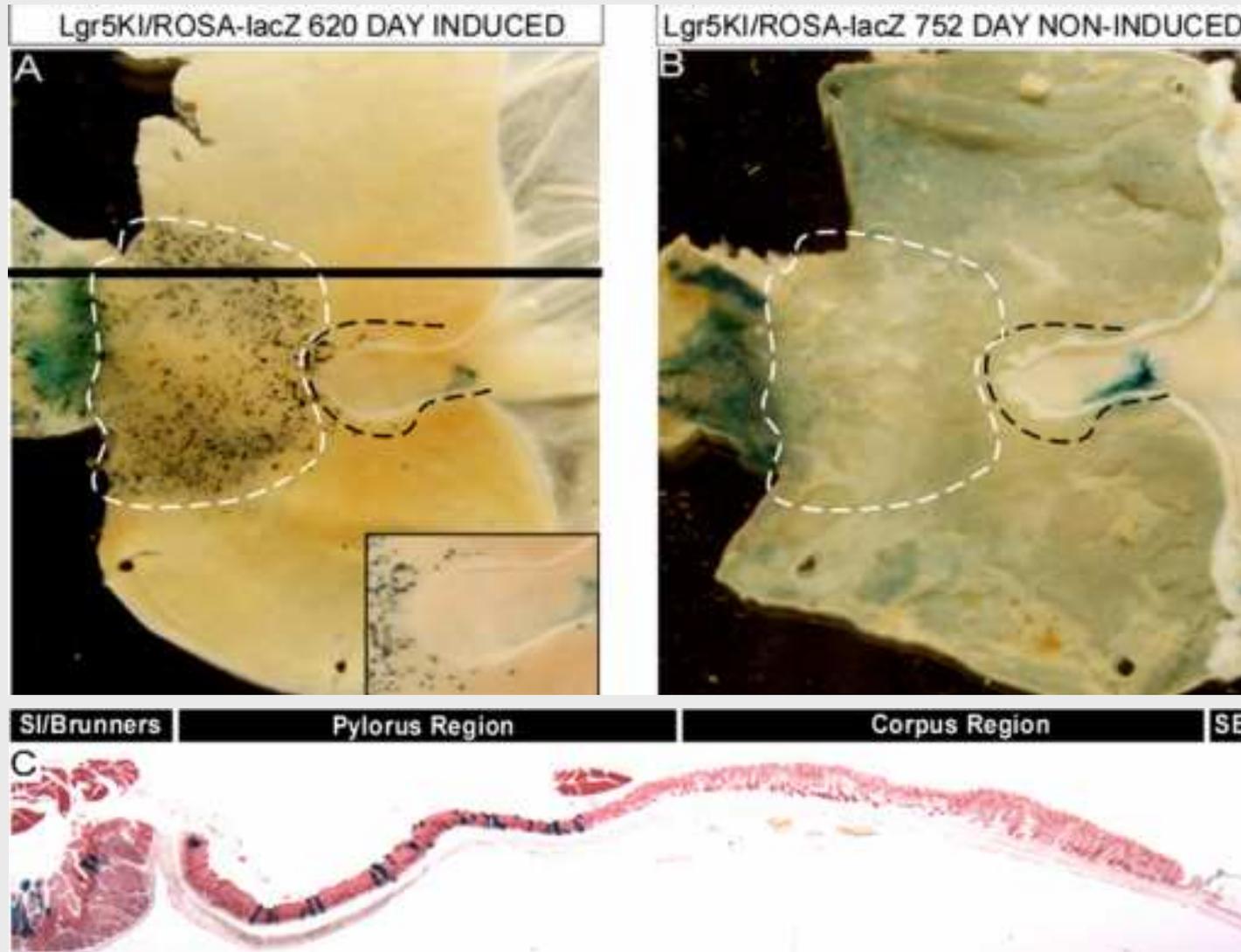
Le cellule alla base delle ghiandole piloriche sono responsabili del rapido rinnovamento dell'epitelio nell'adulto

Tempi successivi dopo induzione



Lgr5 è espresso nel piloro e in una piccola regione vicino all'esofago

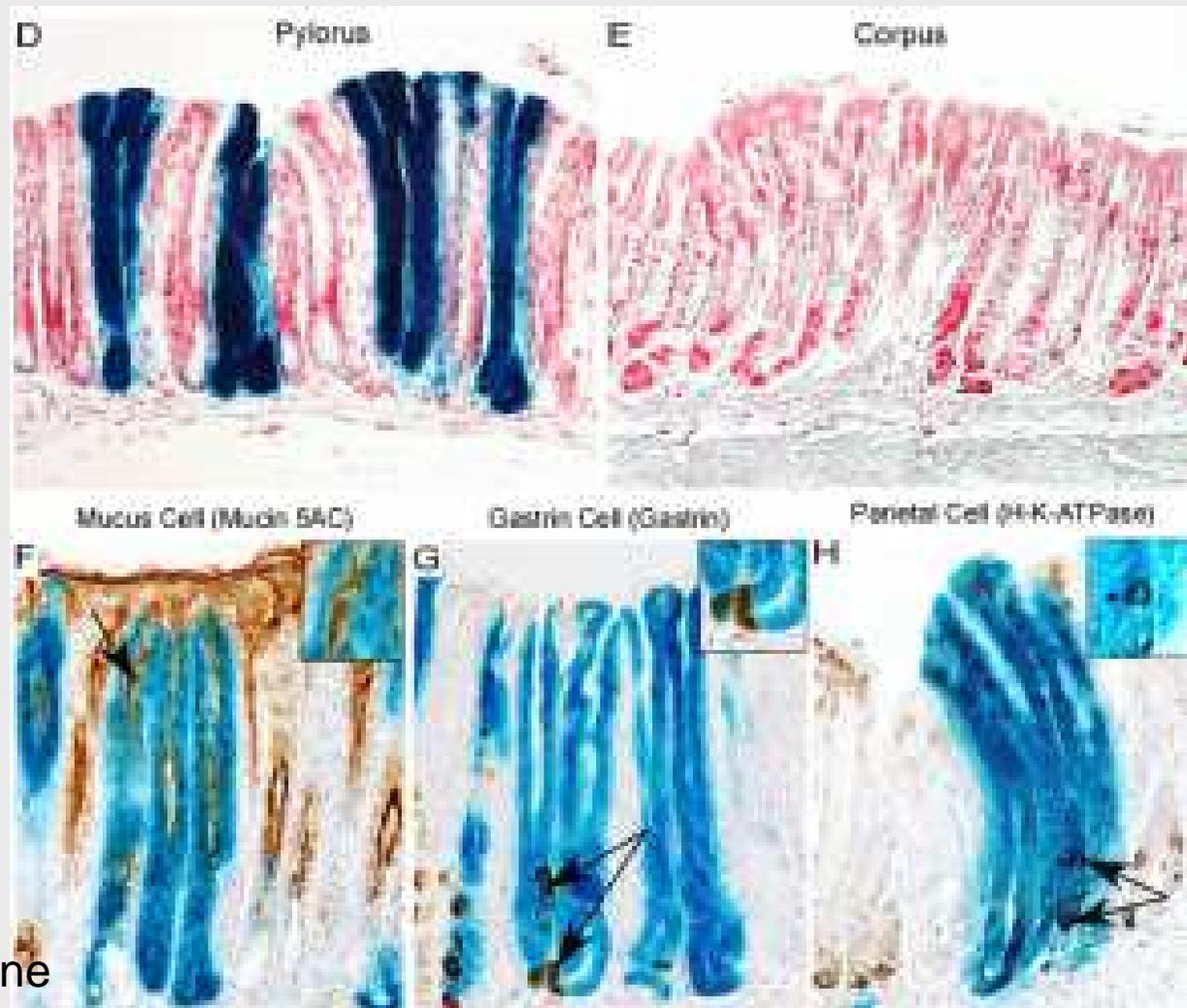
Topi di circa 2 anni



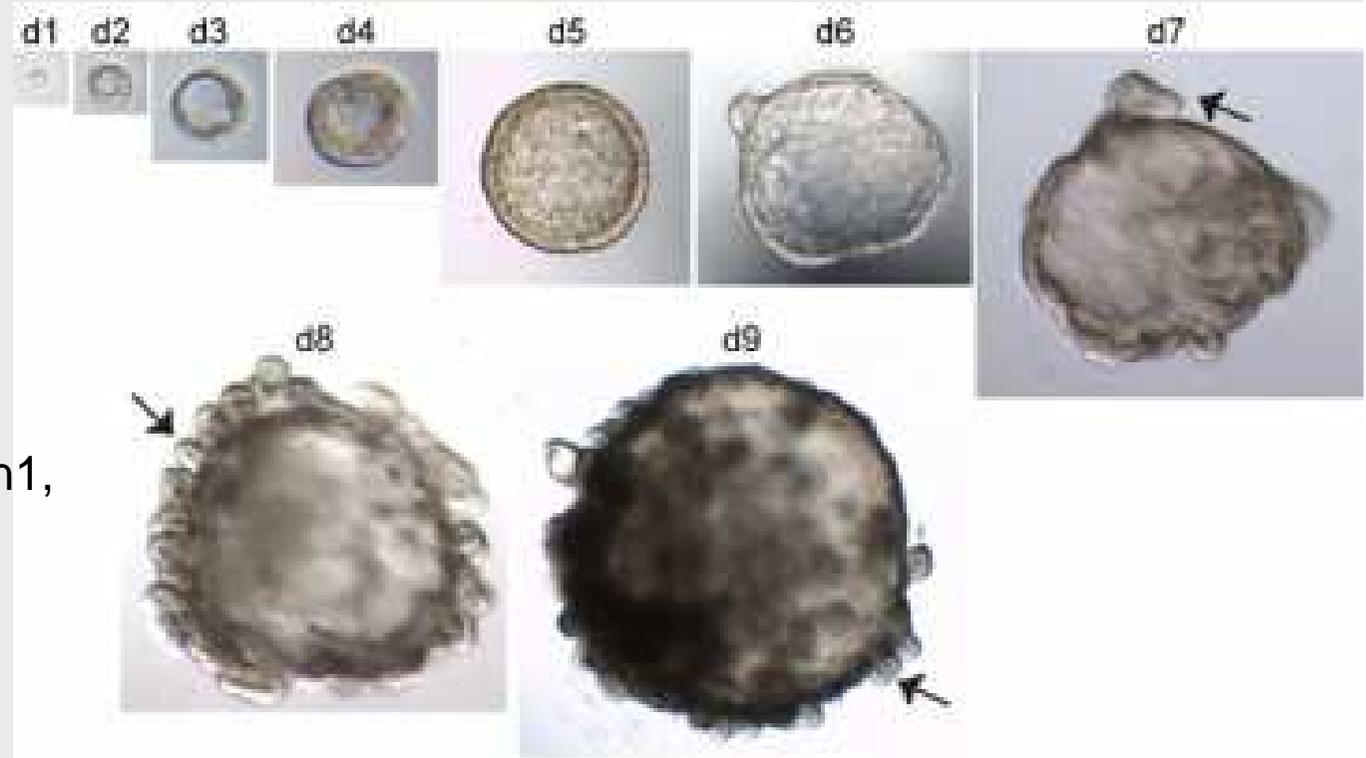
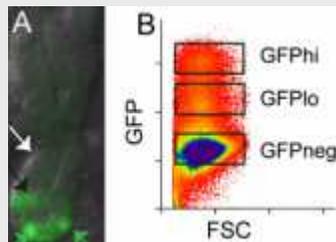
Cellule Lgr5+ solo nel piloro e non nel corpo

Le cellule clonali Lgr5 danno origine ai diversi tipi cellulari

Il # delle unità marcate non cambia nel tempo
→ Tutte derivano da un progenitore che si mantiene

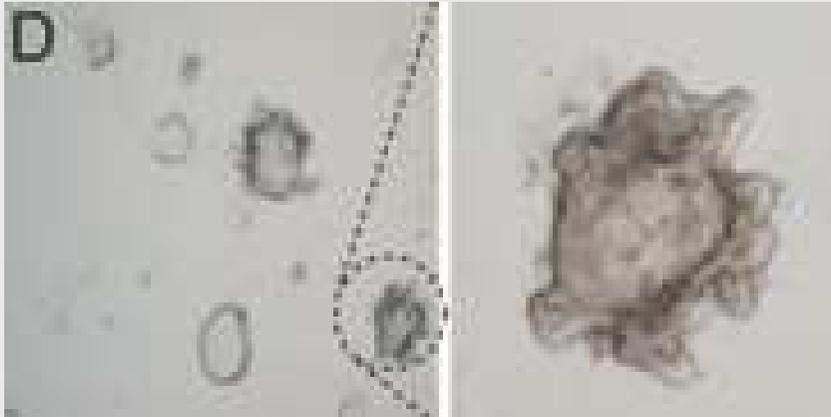


Una singola cellule Lgr5+ coltivata in vitro dà origine a un organoide

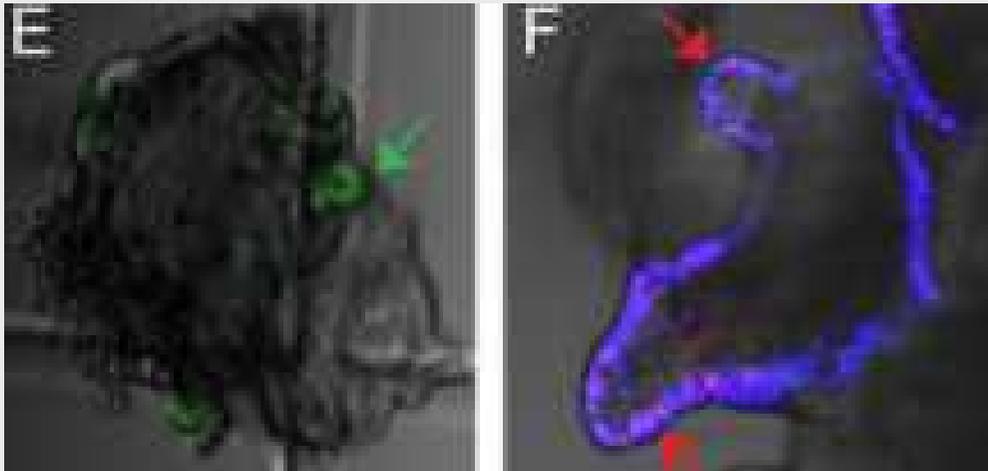


Cellule coltivate in:
Matrigel (simil-gelatina)
EGF, Noggin, R-spondin1,
Wnt3A,
FGF10

organoidi

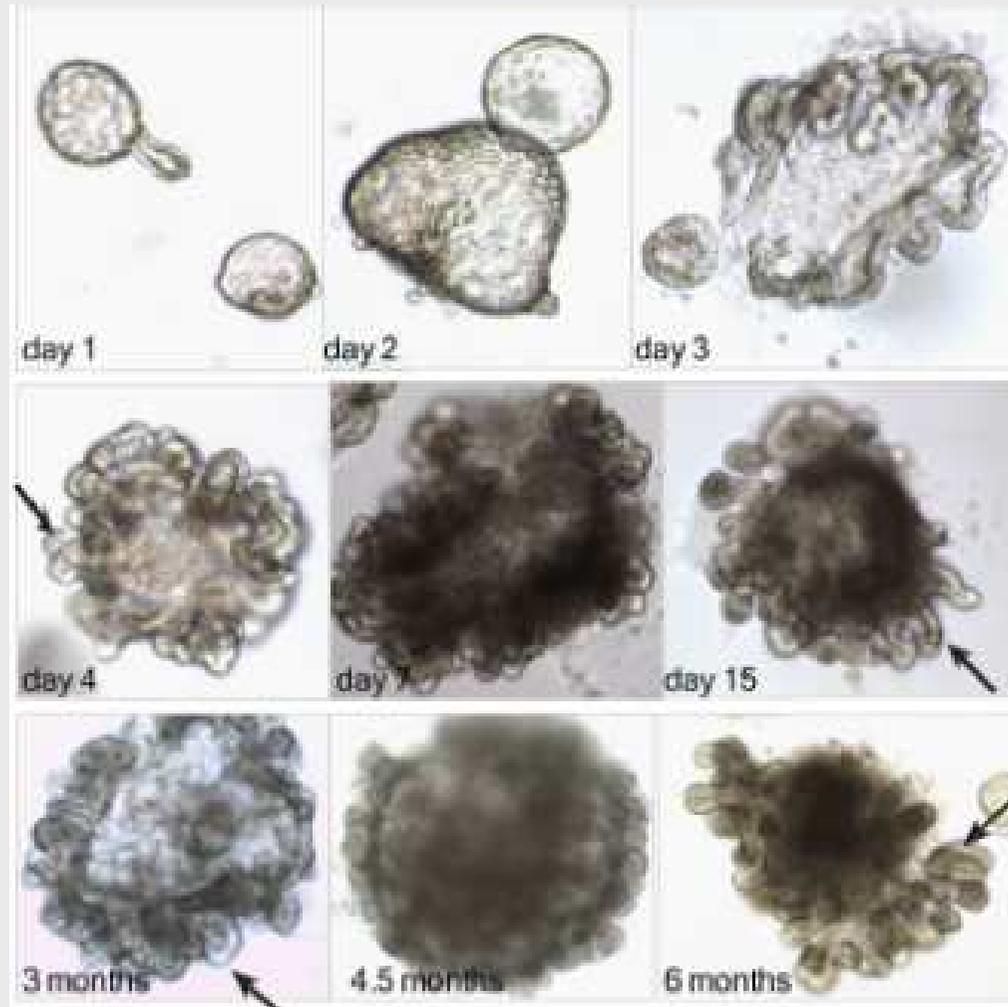


Le cellule possono essere mantenute per mesi in coltura. Il 9% delle cellule dà origine a nuovi organoidi



Organoidi con forma tubulare monostratificato (E-cad+: blu):
Le cellule Lgr5+ sono al fondo di pseudoghiandole e incorporano timidina (rosa)

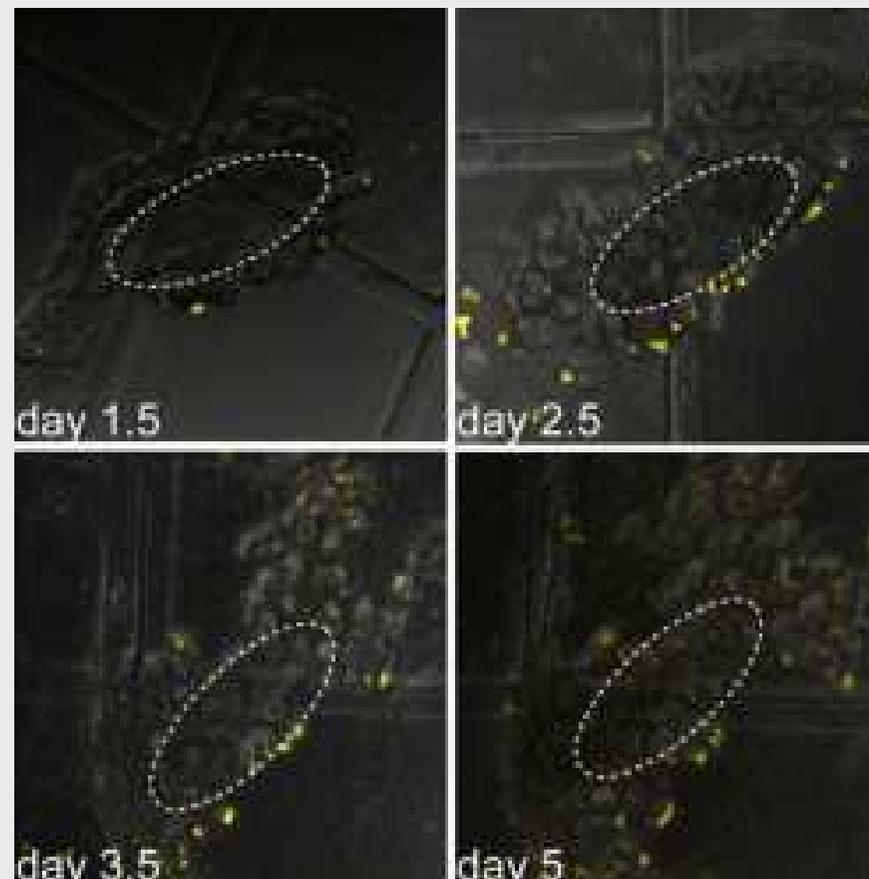
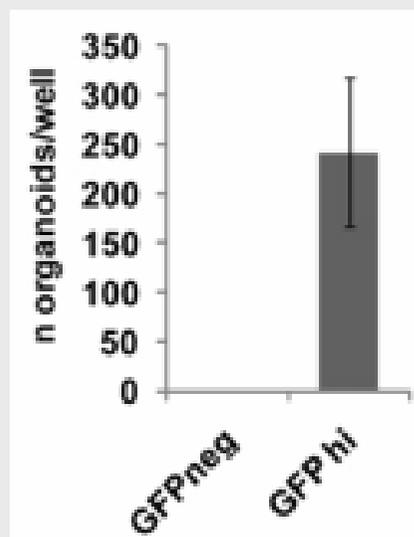
organoidi



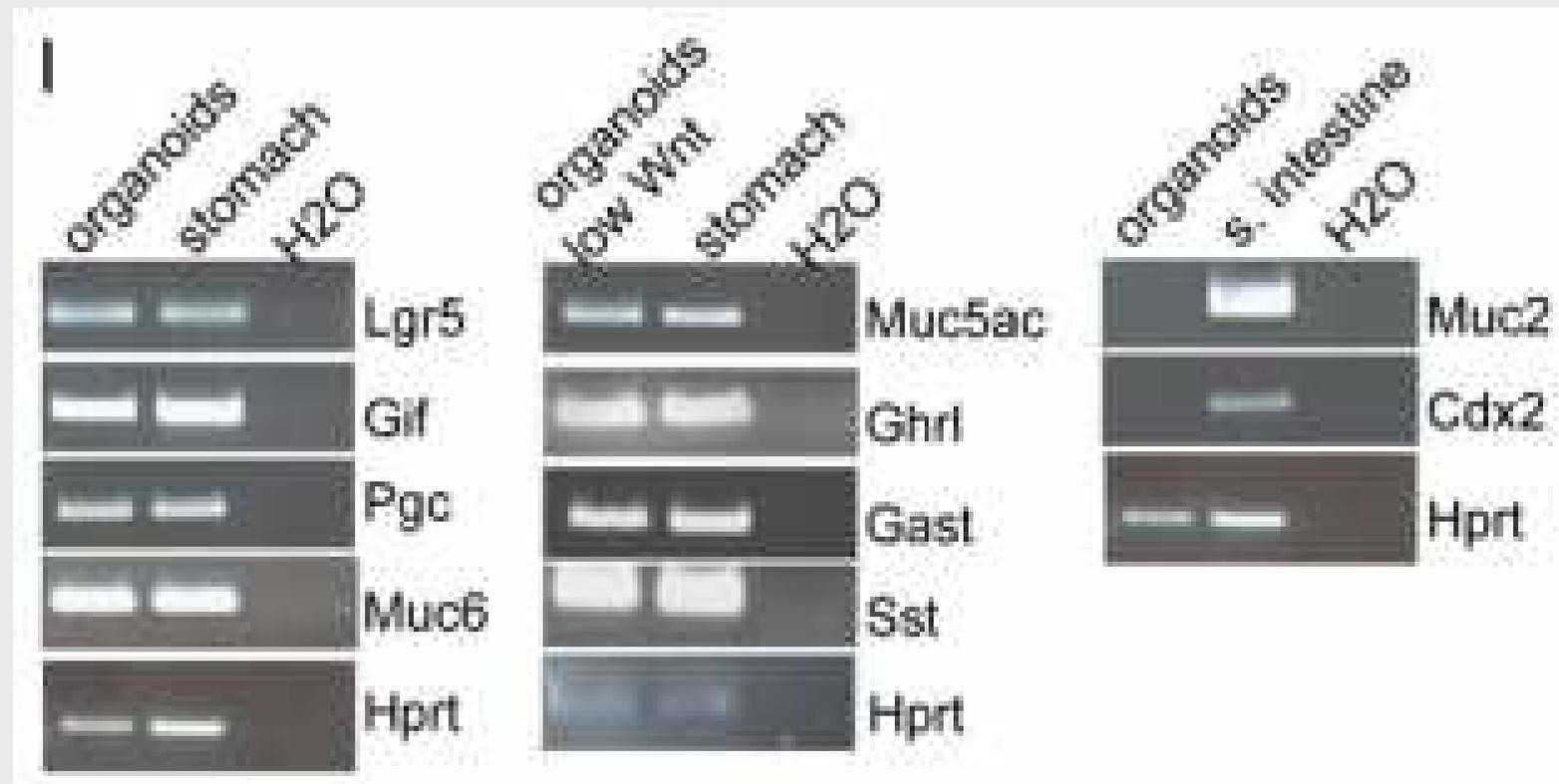
Le cellule all'interno dell'organoide vanno incontro a apoptosi

Cellule Lgr5-GFP+ proliferano

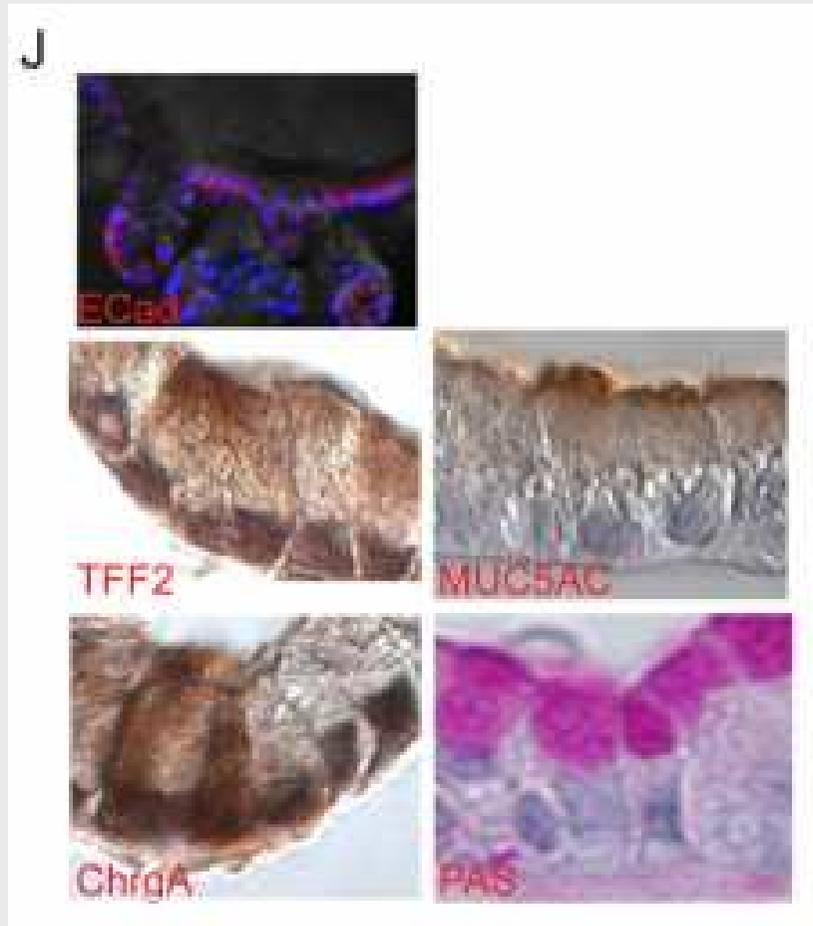
Formano colonie



Gli organoidi esprimono geni stomaco-specifici (high-low Wnt),
ma non intestino-specifici



Riducendo Wnt3A: differenziamento



E-caderin

Marcatori delle
cellule epitelali
gastriche

Profilo di espressione genica (trascrittoma della via Wnt)

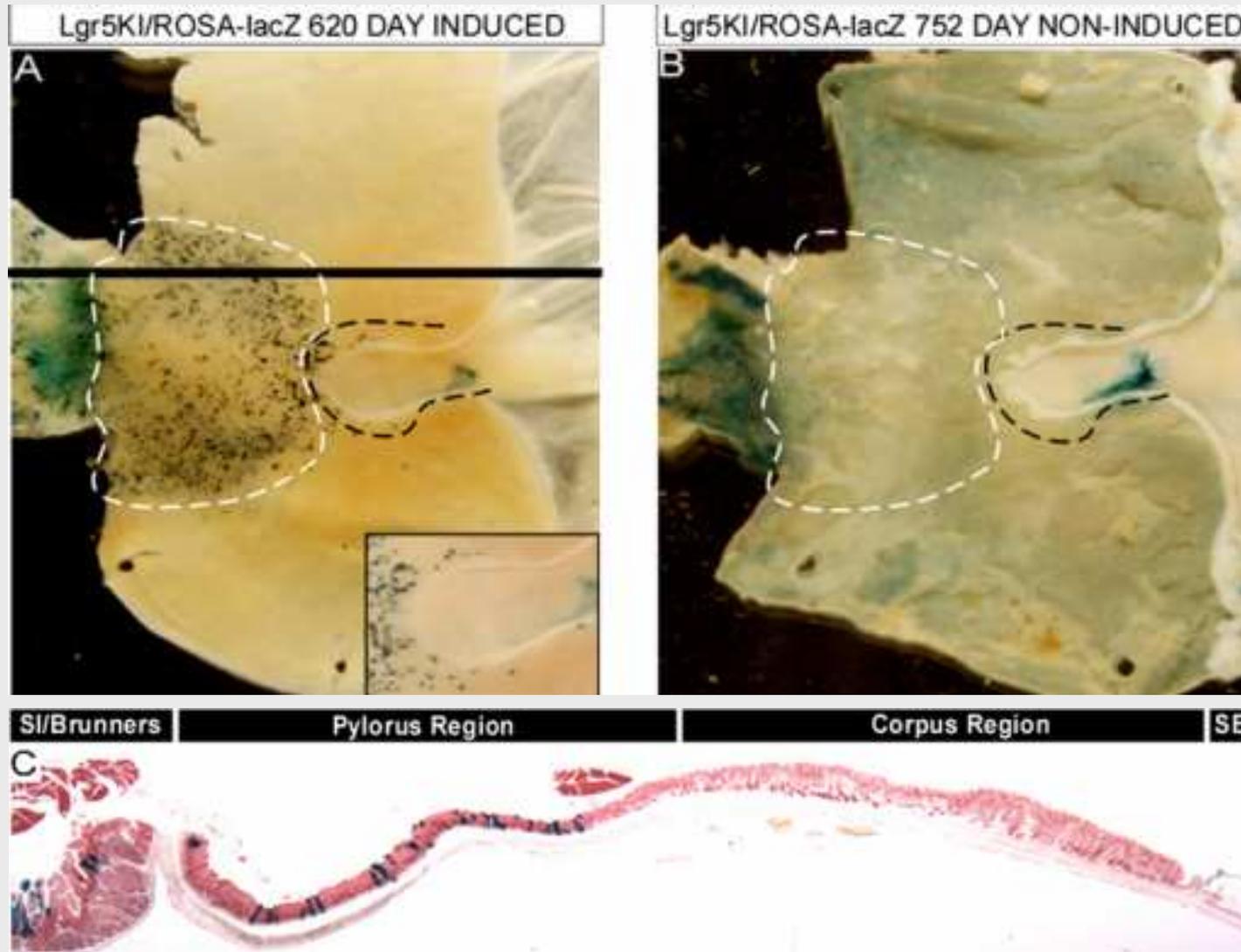
Gene Name	Systematic Name	Average log2 Ratio GFP High/Low	Description
Lgr5	NM_010195	3.13	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
Sp5	NM_022435	2.36	<i>trans</i> -acting transcription factor 5
Sord	NM_146126	2.03	sorbitol dehydrogenase
Cd44	NM_009851	1.84	CD44 antigen, transcript variant 1
Prss23	NM_029614	1.75	protease serine 23
Sox9	NM_011448	1.72	SRY-box containing gene 9
Vegfa	NM_001025250	1.67	vascular endothelial growth factor A (Vegfa), transcript variant 1
Rnf43	NM_172448	1.51	ring finger protein 43
Cldn2	NM_016675	1.48	claudin 2
Bambi	NM_026505	1.29	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog
Nelf	NM_001039386	1.17	nasal embryonic LHRH factor (Nelf), transcript variant 1
Enc1	NM_007930	1.06	ectodermal-neural cortex 1

Questa via è coinvolta in questo programma di Staminialità (ca. 50% dei geni bersaglio di Wnt sono attivati)

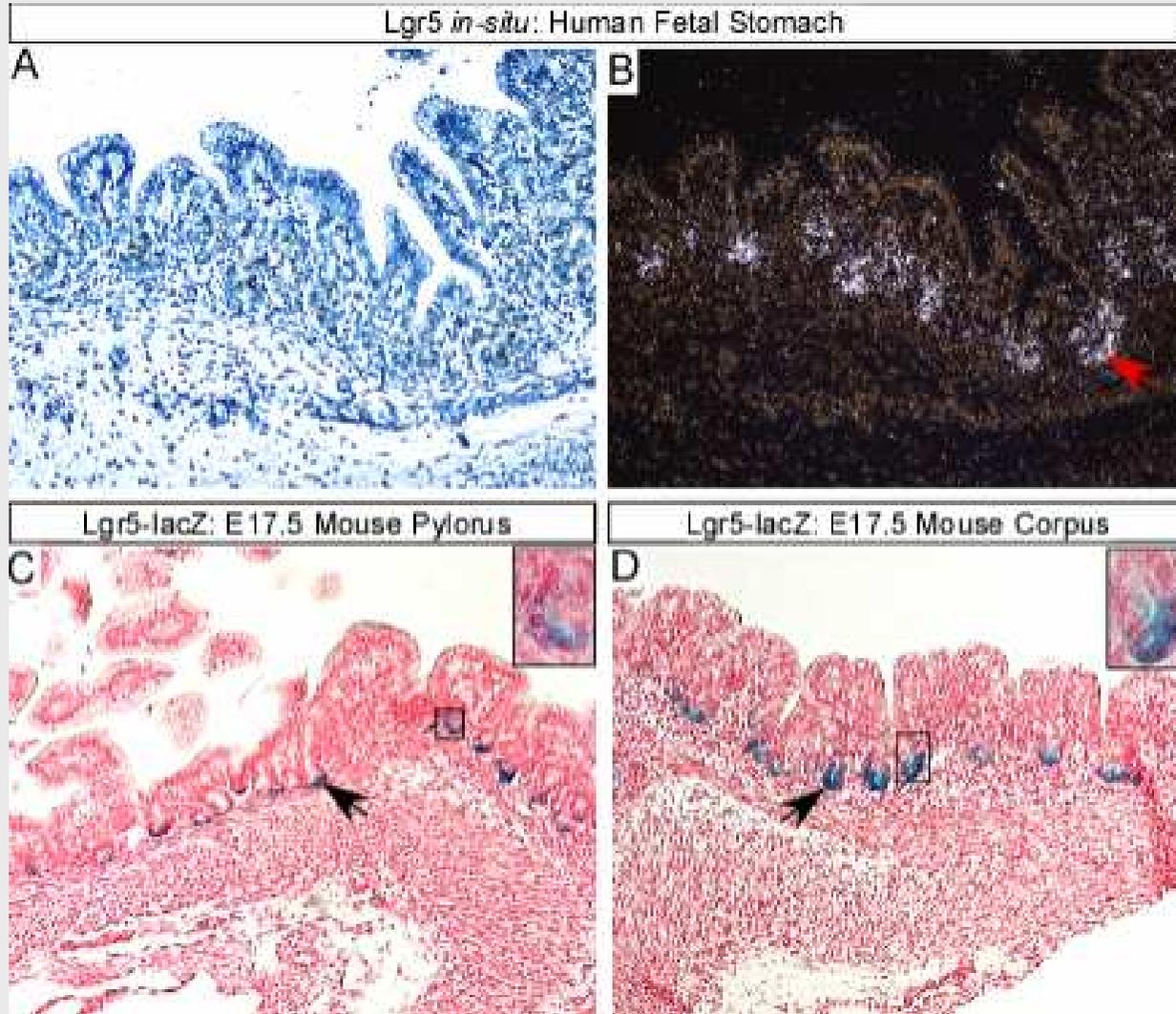
Diminuita espressione di **Lgr5** in cellule che si differenziano, che esprimeranno già marcatori di diff (somatostatina, gastrina)

Lgr5 è espresso nel piloro e in una piccola regione vicino all'esofago

Topi di circa 2 anni



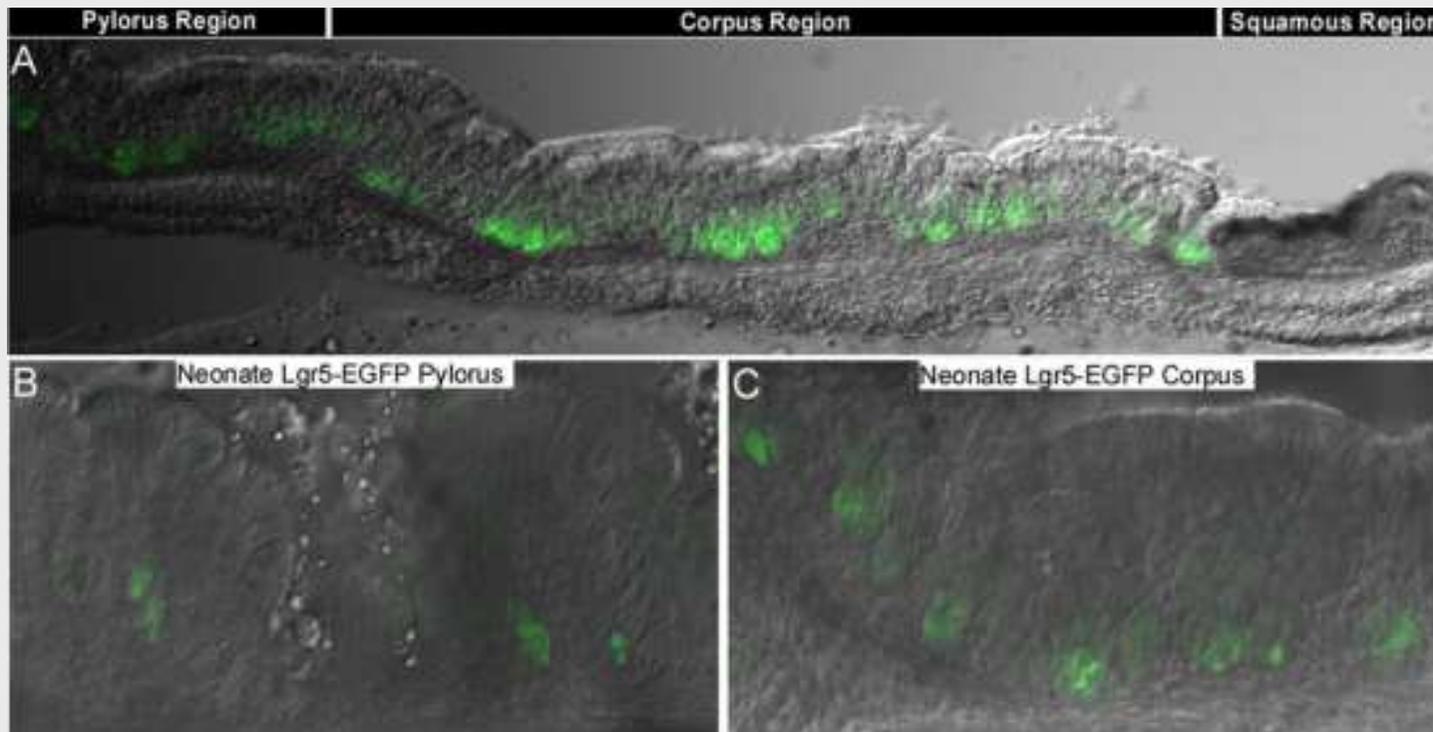
Espressione di Lgr5 nello stomaco in via di sviluppo



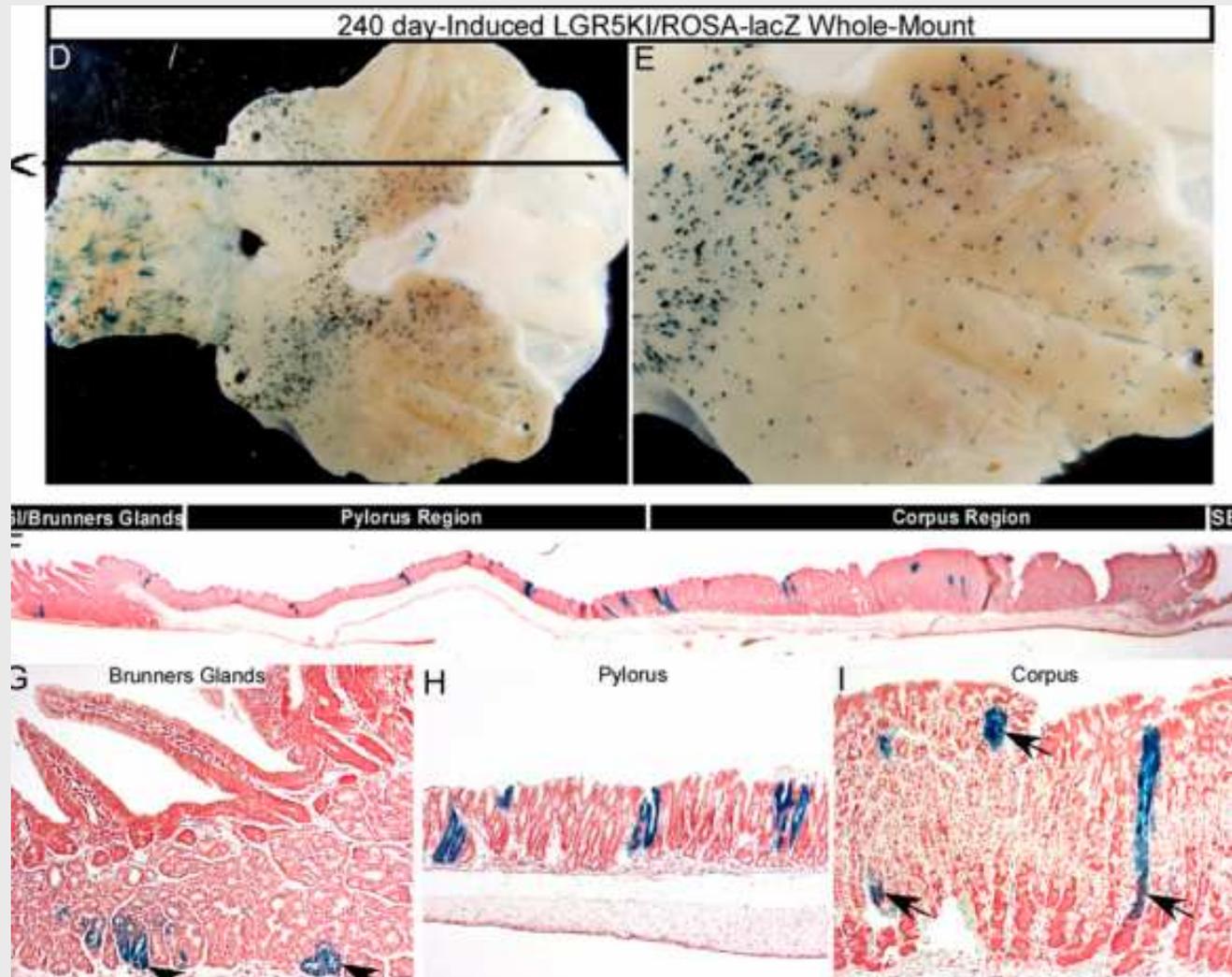
Uomo:
13.5 settimana

Topo
Stadio E17.5

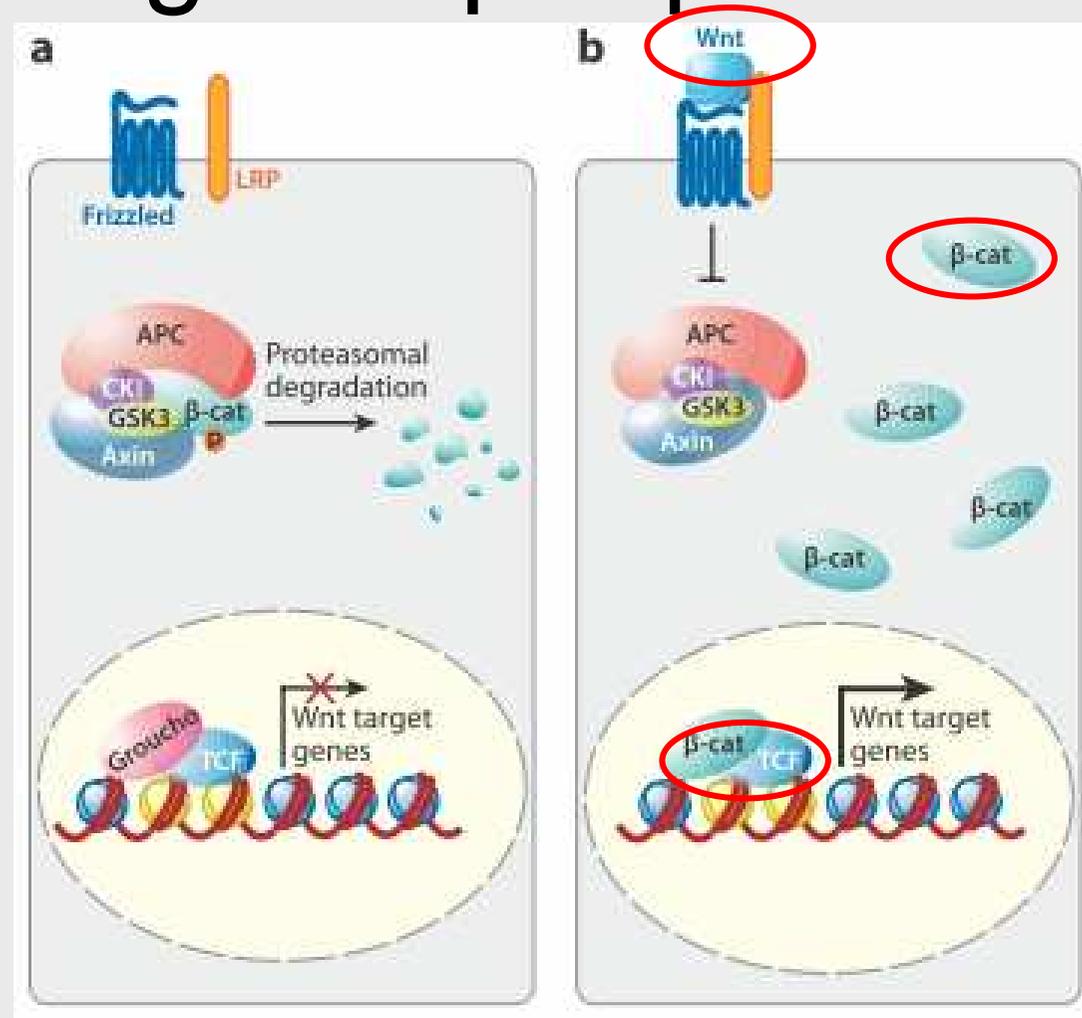
Cellule Lgr5-GFP+ nello stomaco in via di sviluppo del neonato



Cellule Lgr5+ del neonato vanno a formare l'epitelio del corpo dello stomaco (induzione tamoxifene a 1g)

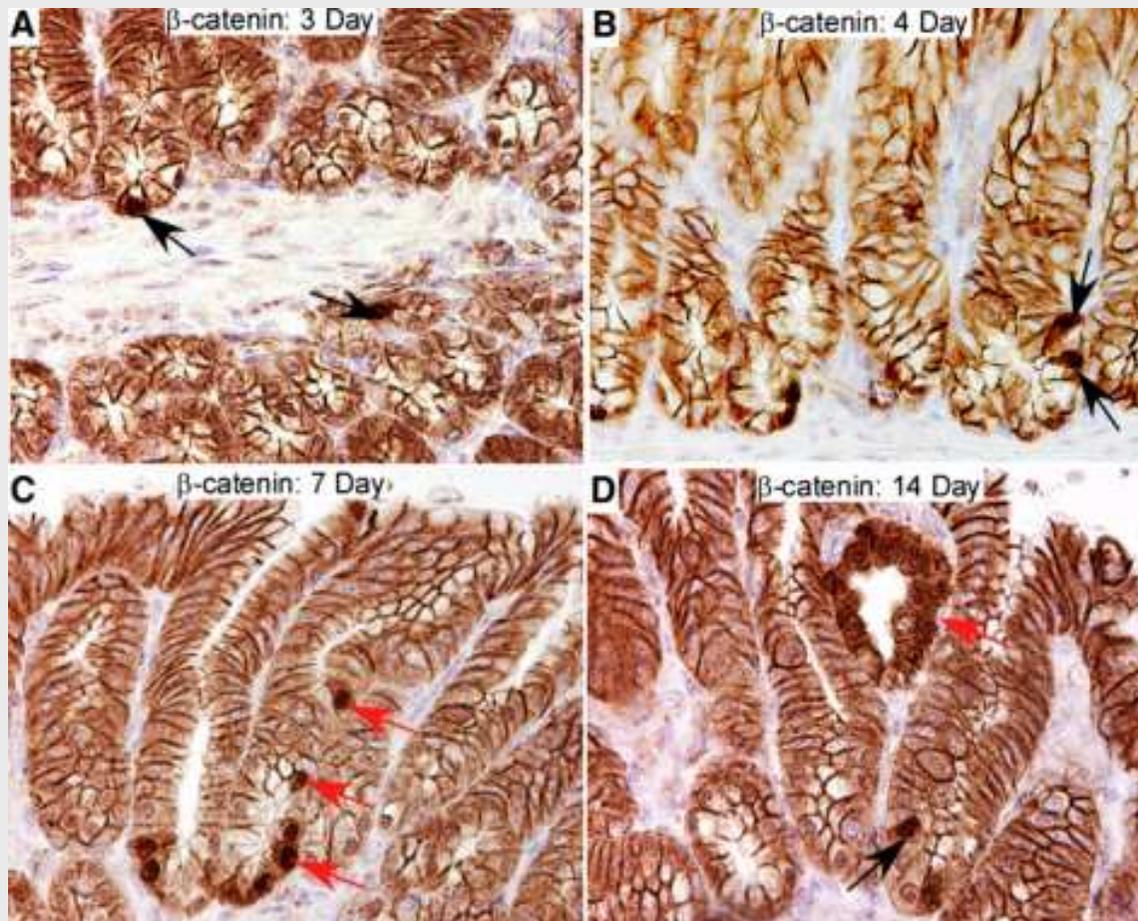


Wnt segnala per proliferazione



Wnt → β-catenin → TCF → CELL PROLIFERATION
(inibendo a uno di questi livelli: NO proliferation)

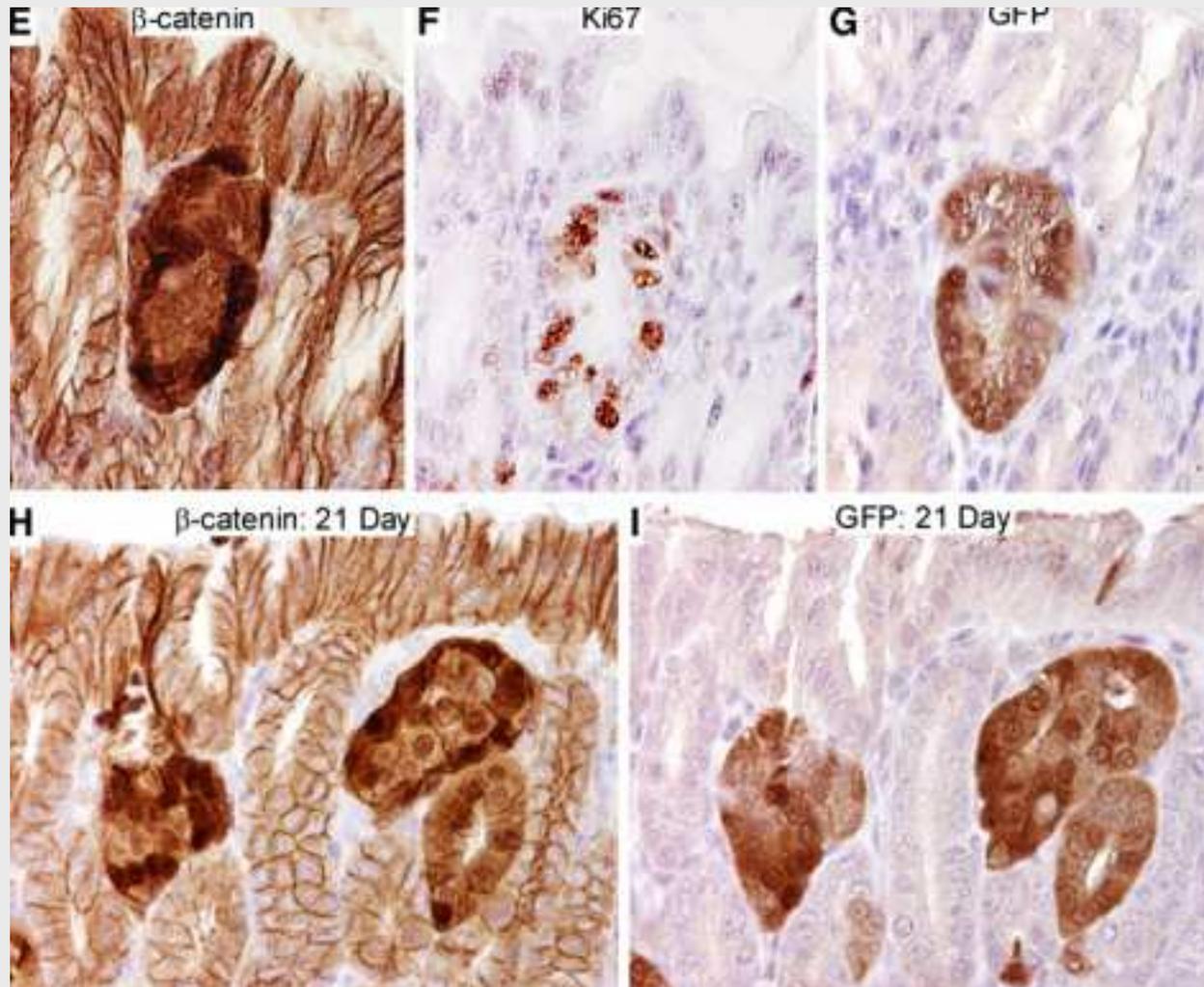
Accumulo di β -catenina 3 g dopo induzione di Lgr5-GFP in topi APC^{mut}



Nel tempo le cellule si muovono verso lo sbocco della ghiandola

→ Proliferazione incontrollata
→ adenoma

Progressione dell'adenoma



Mai trovati adenomi
nel corpo
dello stomaco

Conclusioni I

- Una piccola popolazione di cellule Lgr5+ sono le cellule staminali dell'epitelio gastrico
- Si trovano al fondo delle gh
- 3-4 cellule/futura unità ghiandolare
- Solo nella zona pilorica e al limite gastro-esofageo
- Proliferano, spostandosi distalmente (zona del colletto: qui alta proliferazione-popolazione "transit-amplifying") → differenziano
- Autorinnovamento, multipotenzialità

Conclusioni II

- Autorinnovamento, multipotenzialità
- Si mantengono per tutta la vita
- Durante sviluppo post-natale alcune vanno anche nel corpo dello stomaco
- Nell'adulto non necessarie (< turnover)
- Via di Wnt coinvolta nello sviluppo dell'epitelio delle gh dello stomaco