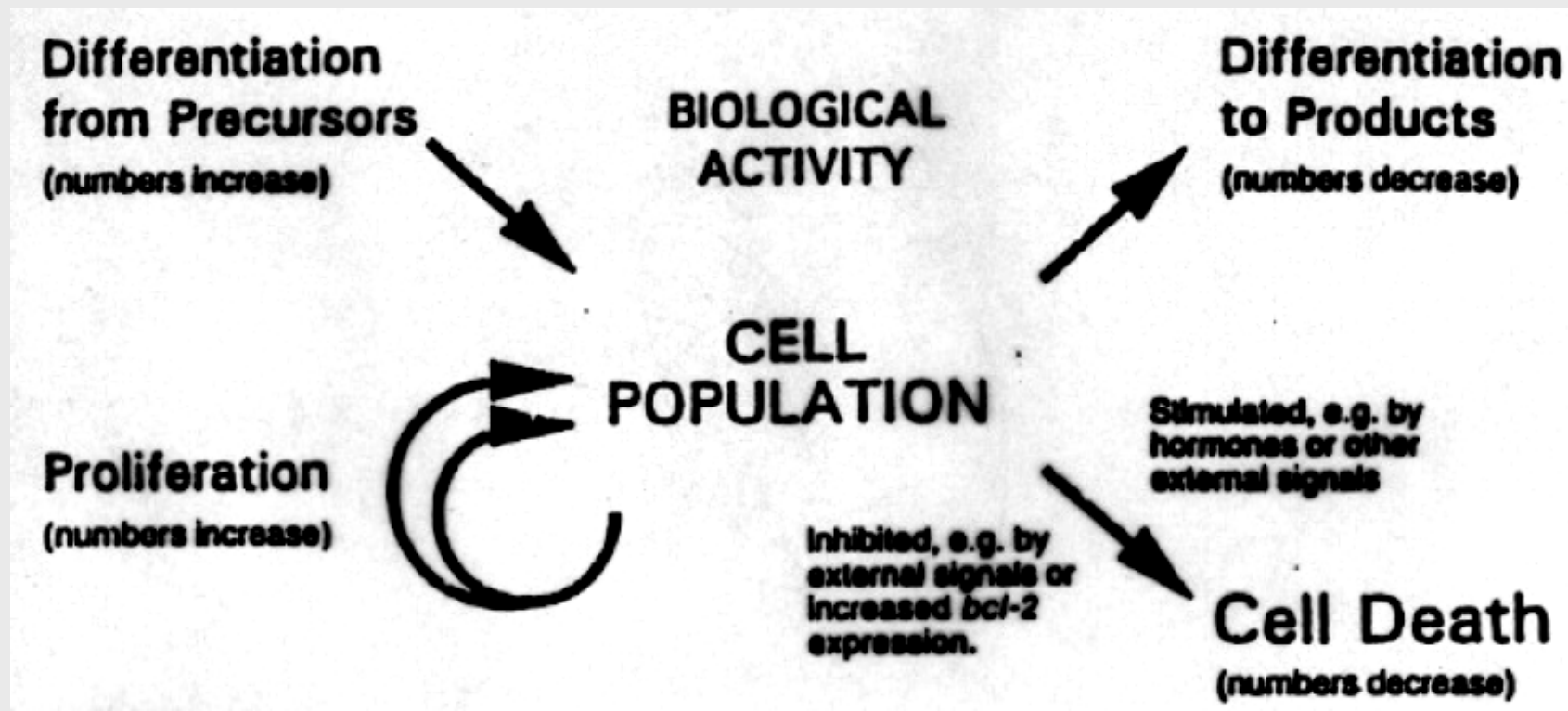
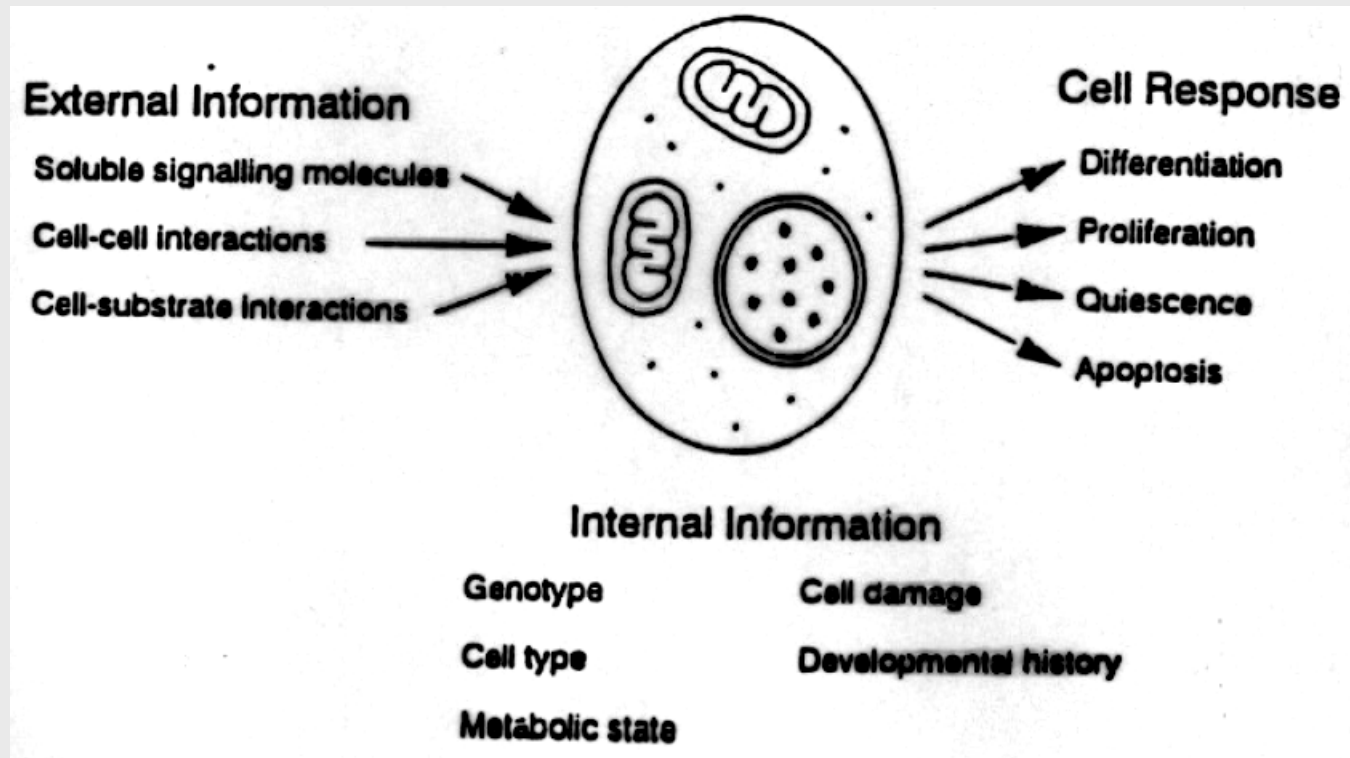


Omeostasi dell'organismo



Le risposte della cellula a stimoli esterni dipendono anche dalla sua storia

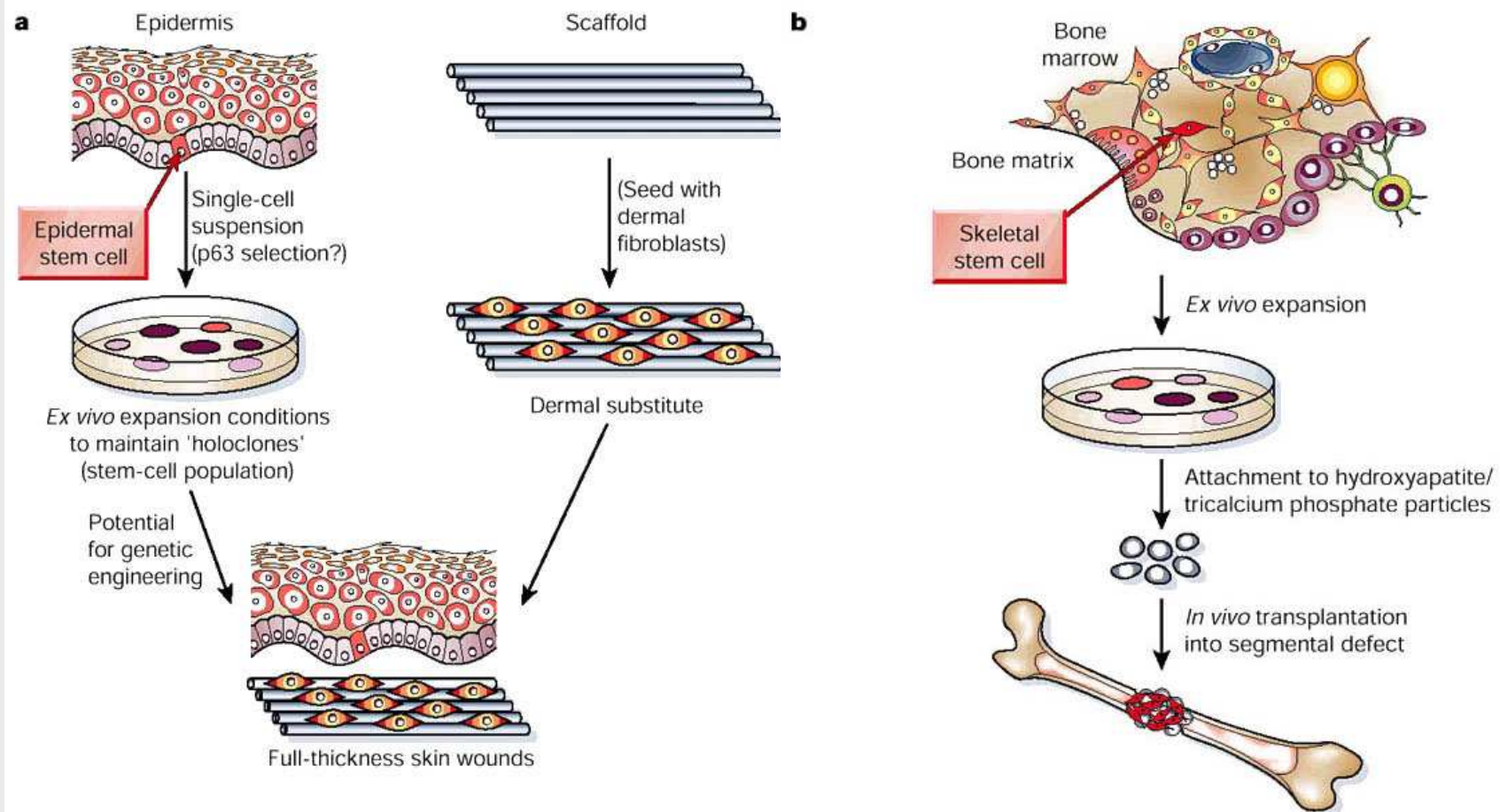


Cellule/tessuti hanno diverso potenziale proliferativo (cellula staminale)

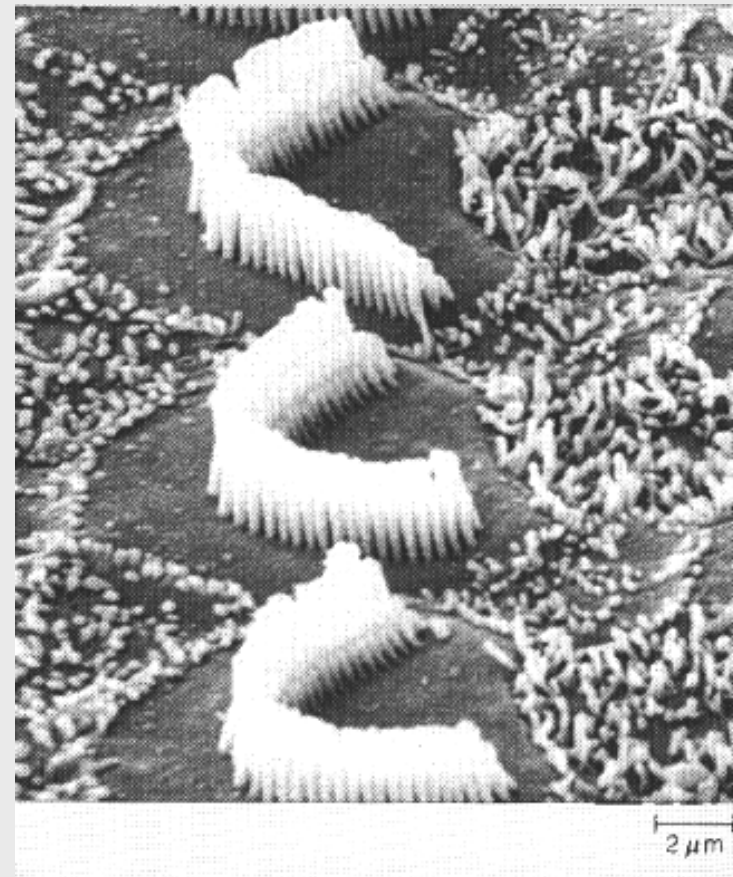
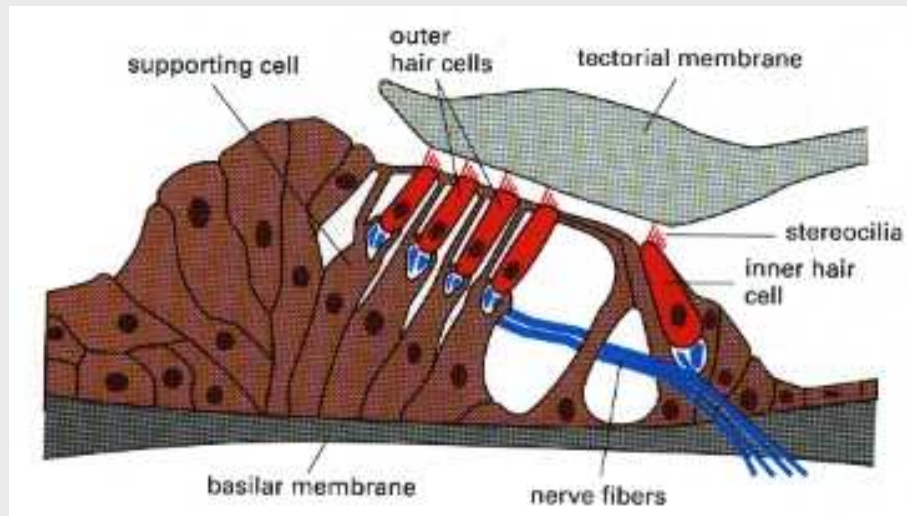
- Riparazione delle ferite (fratture, ferite cutanee)
- Omeostasi dei tessuti **labili**: sangue, epiteli
- Ripopolazione ancorche' minima nei tessuti **"perenni"** nel SNC: neurogenesi molto limitata (ippocampo umano)
- rigenerazione dei tessuti **"stabili"**: muscolo scheletrico: riattivazione cellule satelliti; fegato dopo epatectomia

MA CI SONO ECCEZIONI!!!

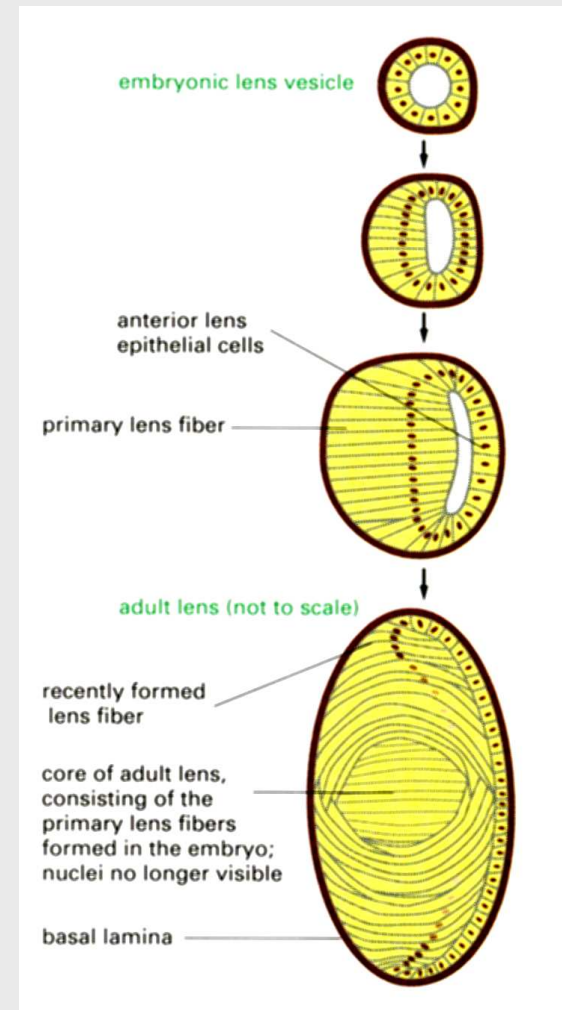
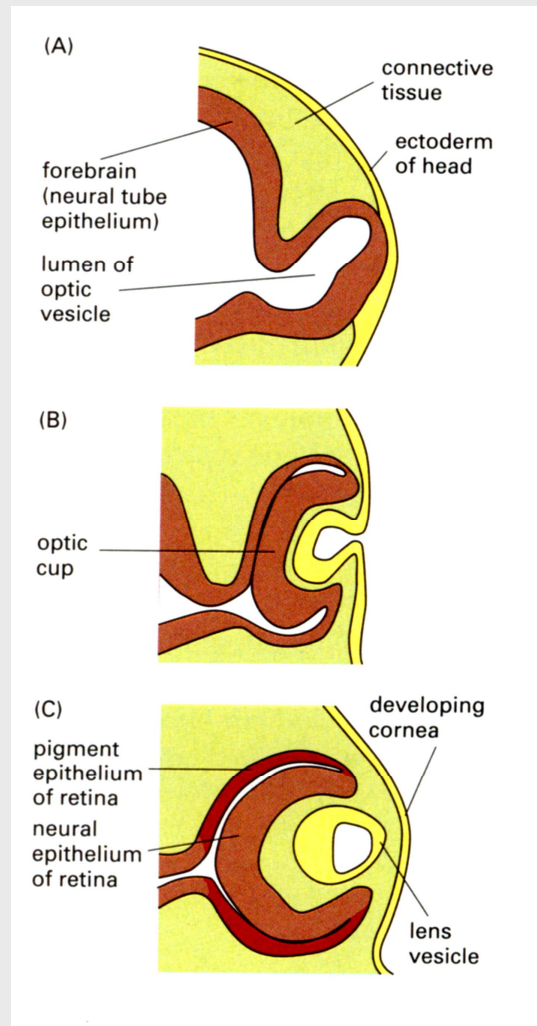
Terapia con cellule staminali umane tessuto-specifiche



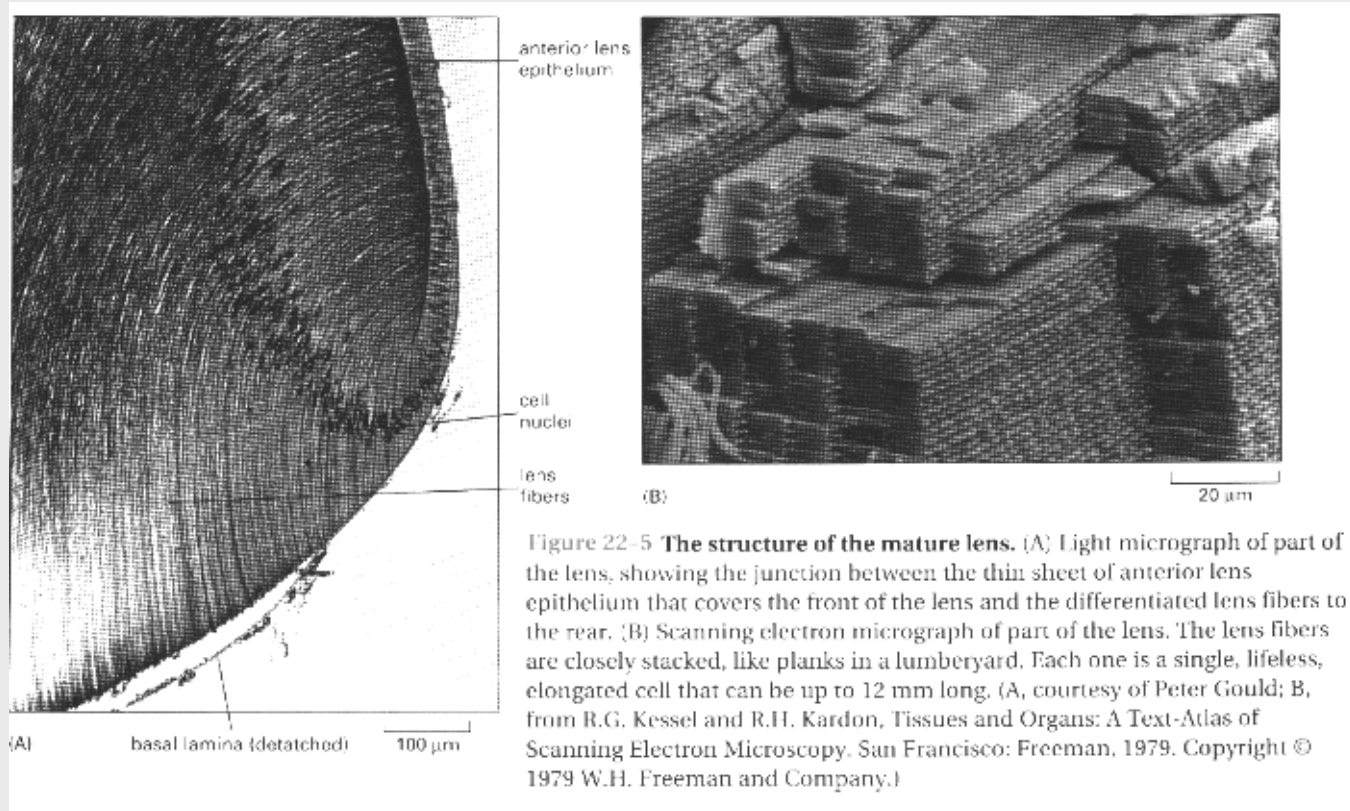
Le cellule capellute (**benchè
epiteliali**) dell'orecchio non sono
soggette a ricambio



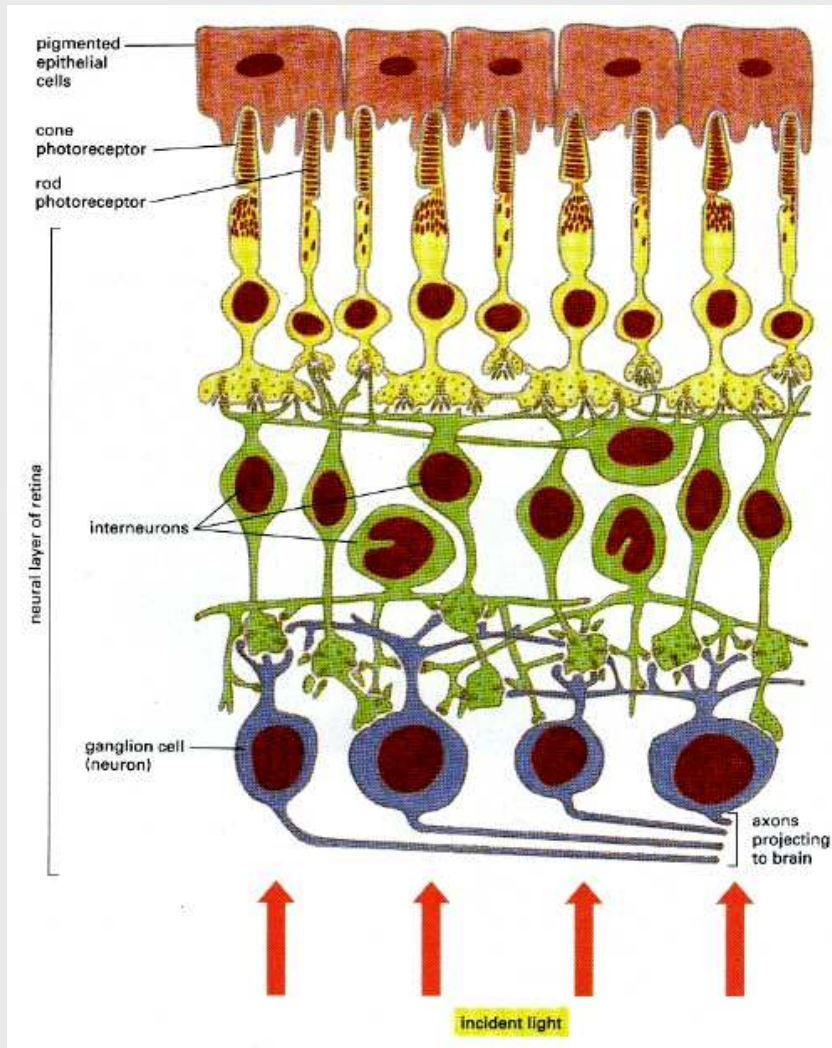
Formazione del cristallino



Il cristallino: le fibre sono strutture perenni



Struttura della retina



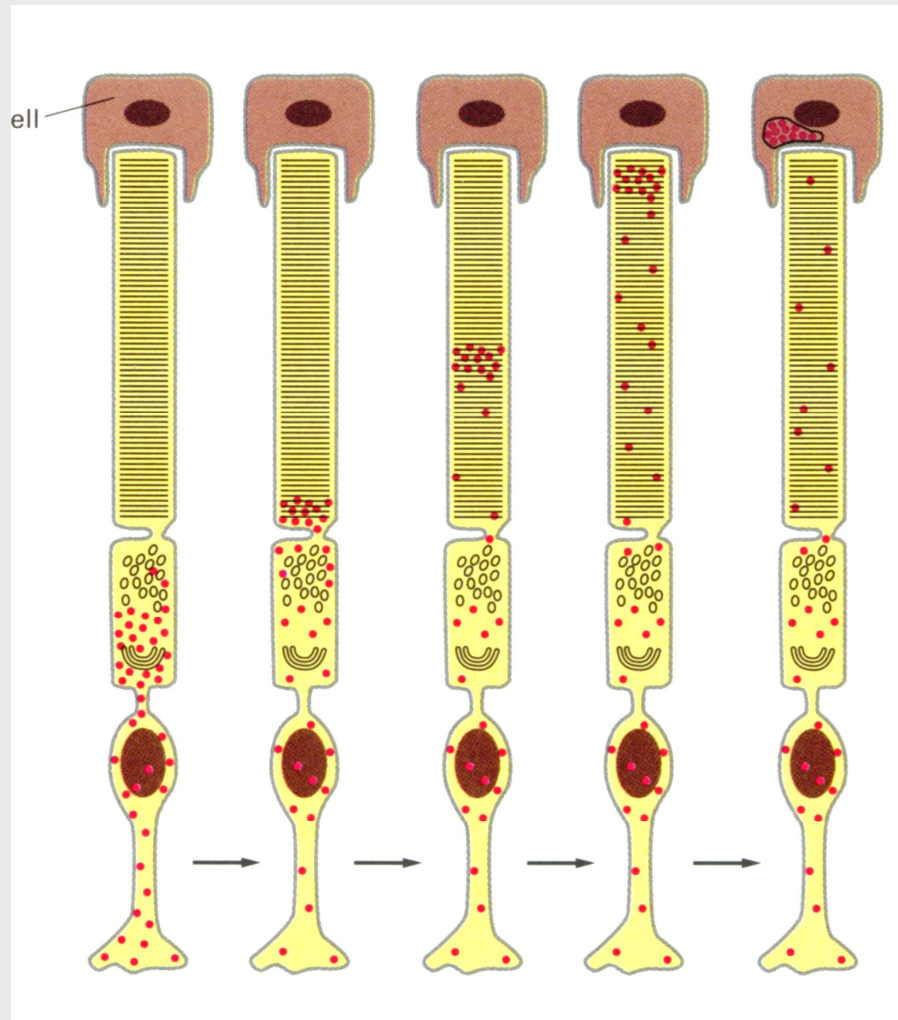
Cellule epiteliali pigmentate

Coni e bastoncelli

Interneuroni

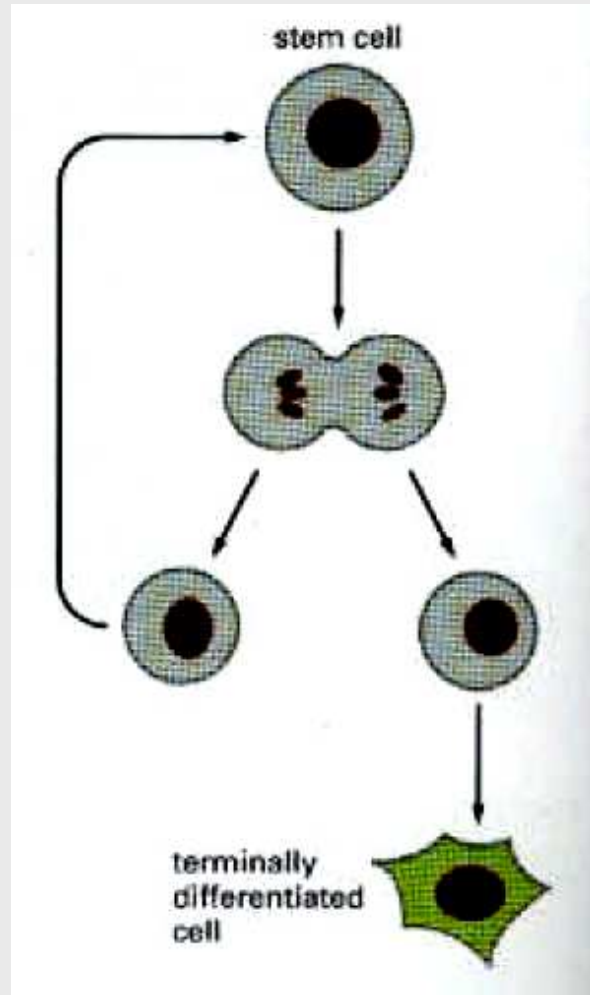
Cellule gangliari (neuroni)

Metabolismo nei bastoncelli della retina (cellule post-mitotiche)



Turnover delle proteine
di membrana
(pulse-chase con
aminoacido radiomarcato)

La cellula staminale



Una cellula in grado
di autorinnovarsi e
di differenziarsi



Viene mantenuta la
riserva

Cellule staminali

- Malattie fino ad oggi incurabili, per le quali si può prospettare un terapia con cellule staminali:
- Sclerosi laterale amiotrofica (ALS), morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer
- Infarto miocardico
- Cirrosi epatica
- Diabete
-

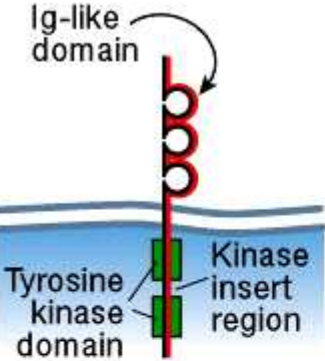
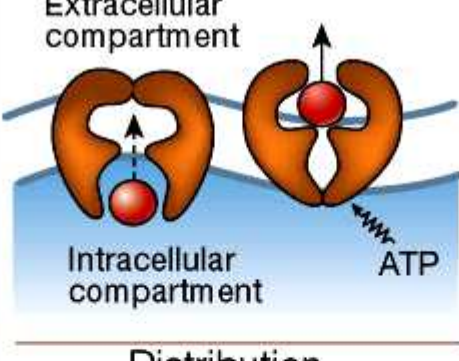
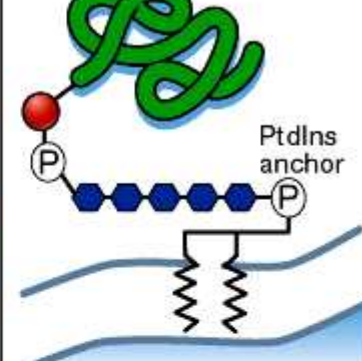
Cellule staminali

- In base all'origine vengono classificate in
- Embrionali (ESC)
- Adulte (ASC)

Cellula staminale adulta

- Non presenta segni molecolari e morfologici di differenziazione (problema dei marcatori e della definizione)
- Ha potenzialita' differenziative illimitate (forse)
- Si divide senza limiti (almeno rispetto alla vita dell'animale)
- Provvede all'automantenimento
- Quando si divide ogni cellula figlia ha la scelta tra automantenimento e differenziazione.
- La divisione puo' essere simmetrica o asimmetrica.
- Le due cellule figlie di solito fanno divisioni simmetriche, ma in termini di popolazione la divisione e' asimmetrica

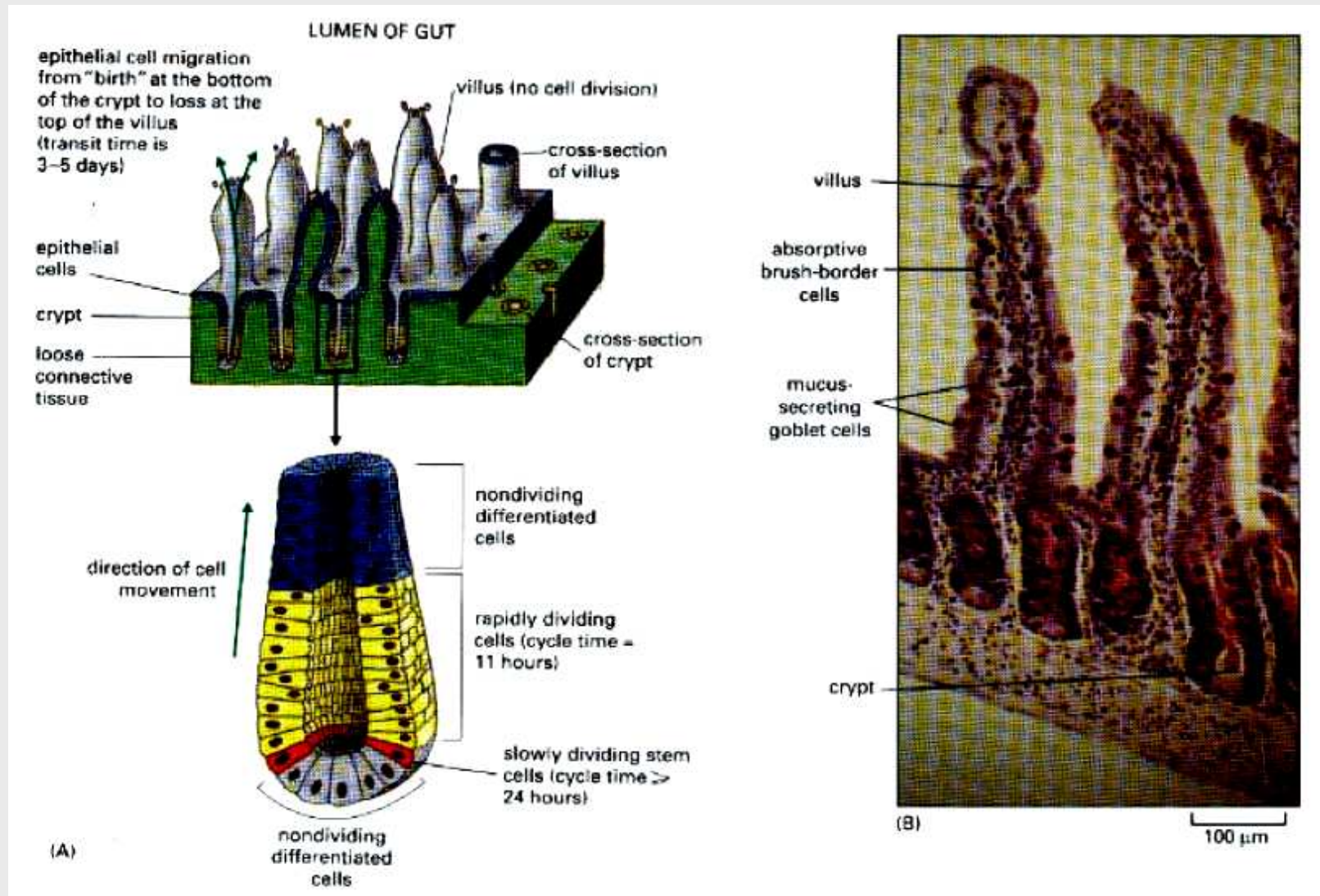
Marcatori di cellule staminali

c-kit 	P-glycoprotein or MRD1 	Sca-1 
Distribution • Melanocytes • Mast cells • Germ cells • Stem cells	Distribution • Hepatocytes–cholangiocytes • Brush border cells • Renal tubular cells • Endothelial cells (brain) • Cancer cells • Stem cells	Distribution • Vessel wall • Kidney cortical tubules • Thymus, spleen • T lymphocytes • Stem cells
Functions • Proliferation • Migration • Differentiation • Secretion	Functions • Transmembrane efflux pump • Inhibition of apoptosis	Functions • Cell adhesion • Cell signalling • T-cell activation

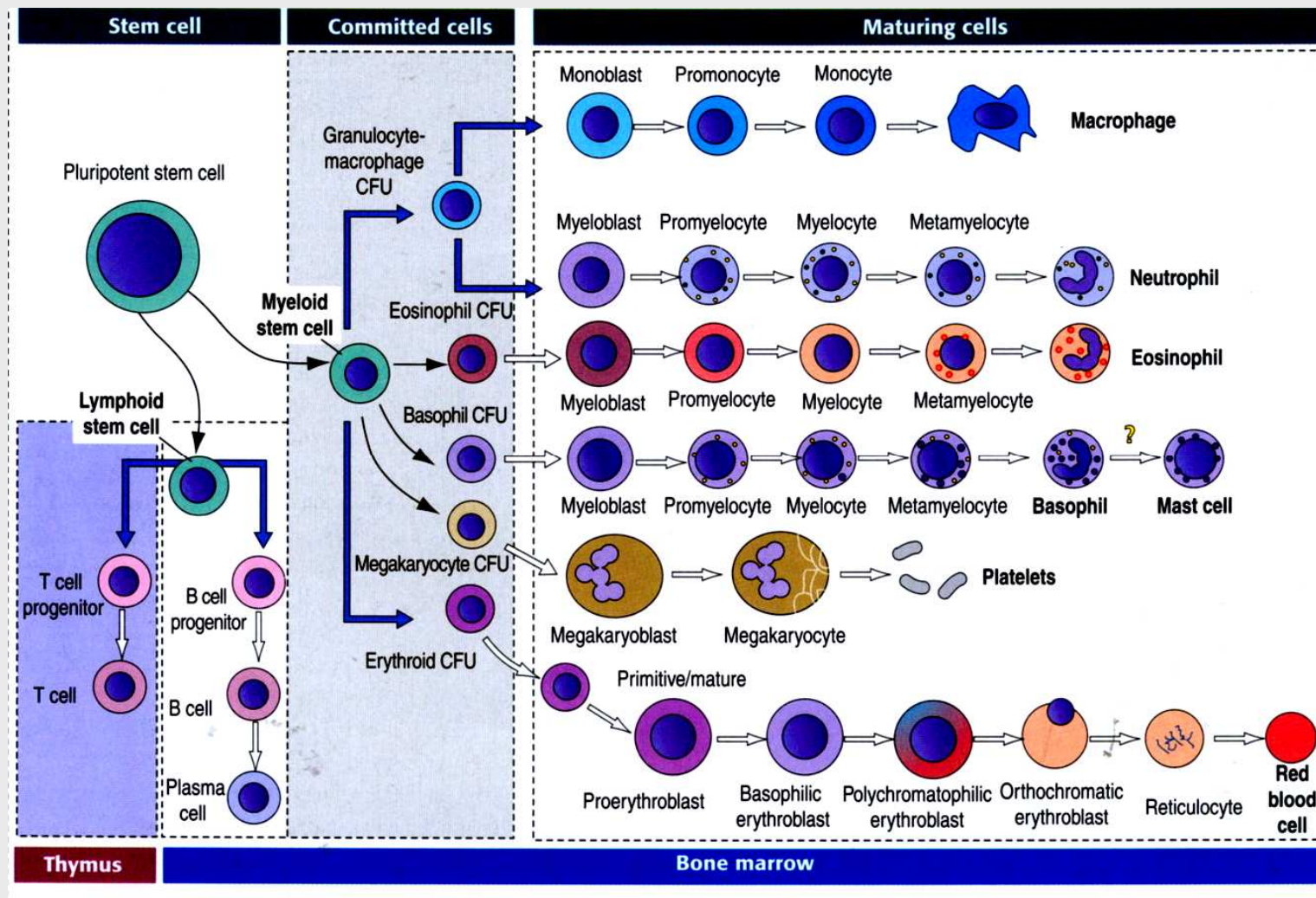
Cellule staminali dell'adulto

- Presenti soprattutto nei tessuti a ricambio fisiologico: **epiteli e sangue**
- Trovate anche in altri tessuti a ricambio limitato: **muscolo scheletrico** (cellule satelliti)
- Recentemente evidenziate, anche se molto limitatamente, in tessuti una volta considerati “perenni”: **nervoso e miocardio**

Cellule staminali dell'apparato GI

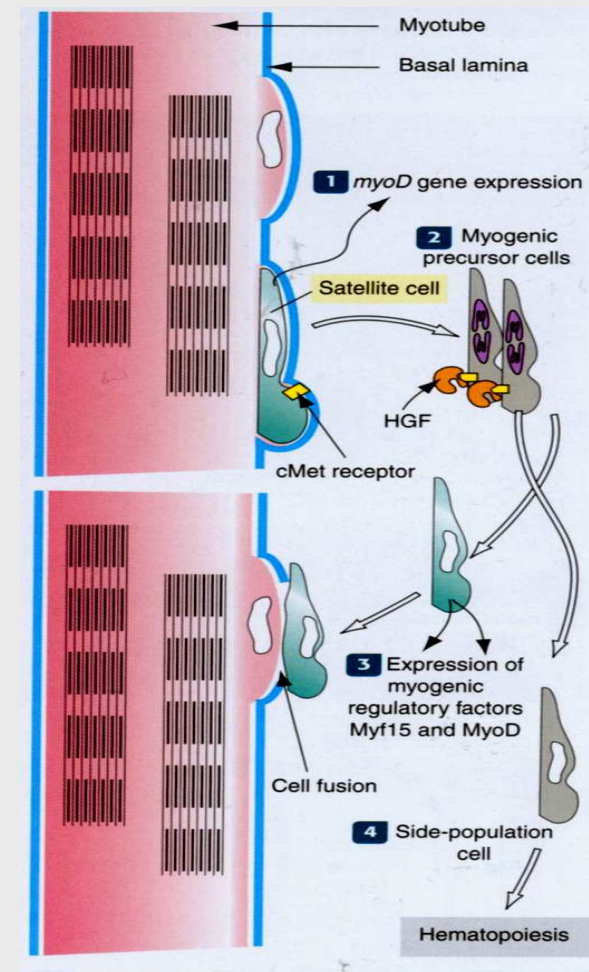
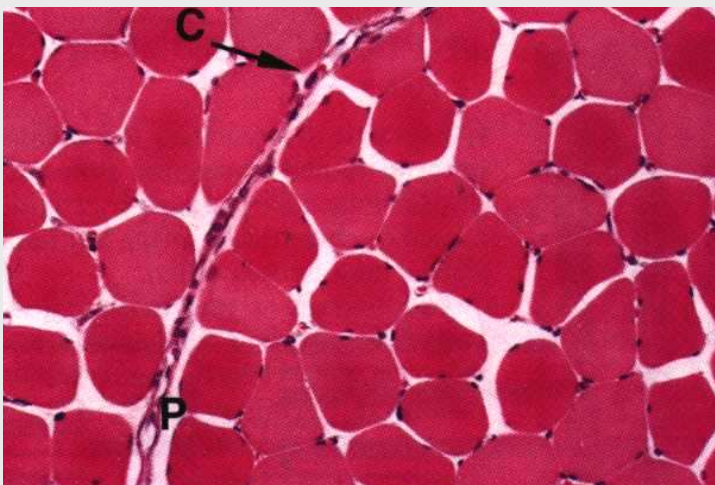
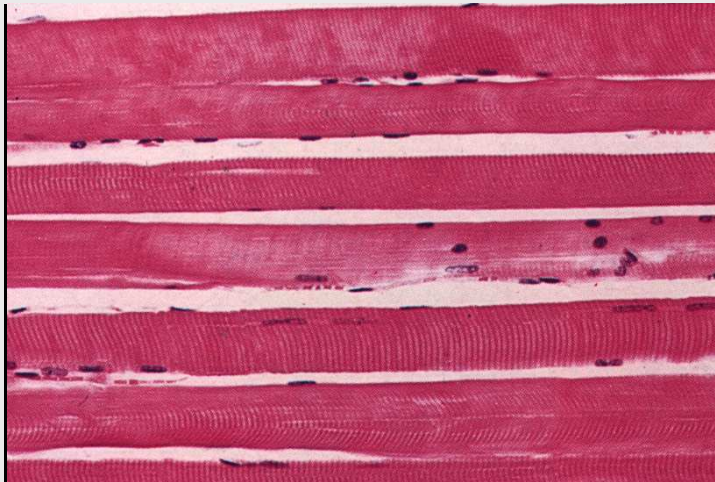


La cellula emopoietica staminale



CFU = Colony Forming Unit

La cellula staminale del muscolo scheletrico (cellula satellite)

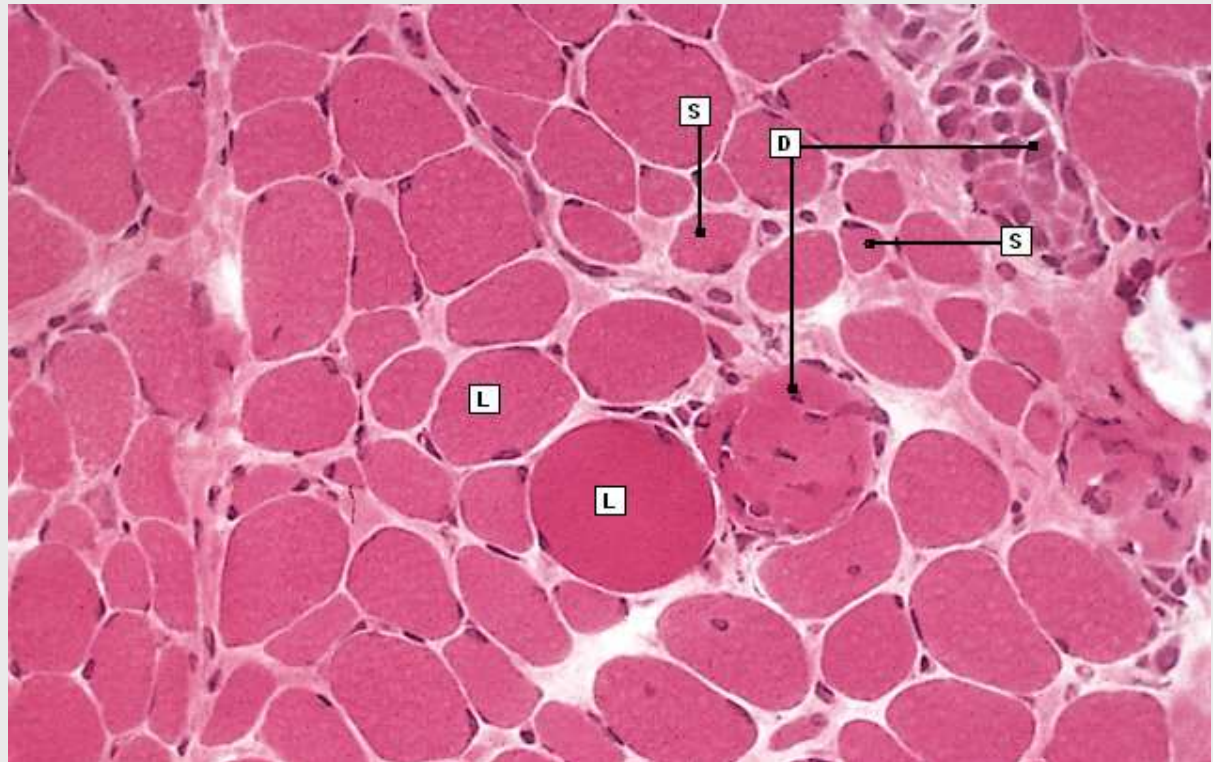
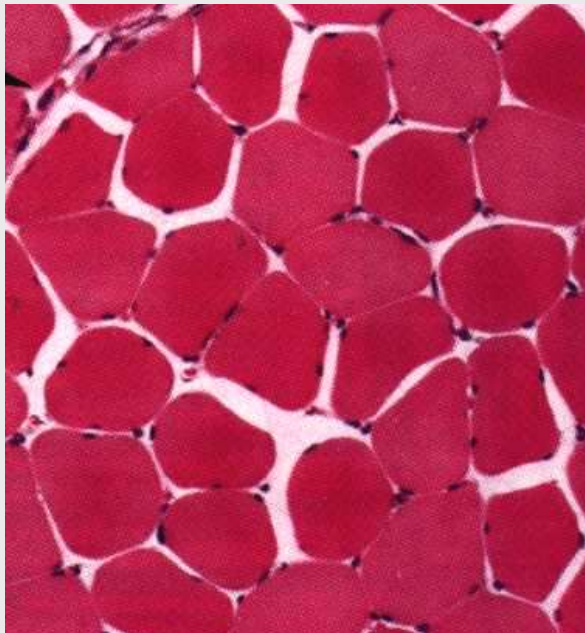


Distrofia muscolare di Duchenne: difetto del gene della distrofina

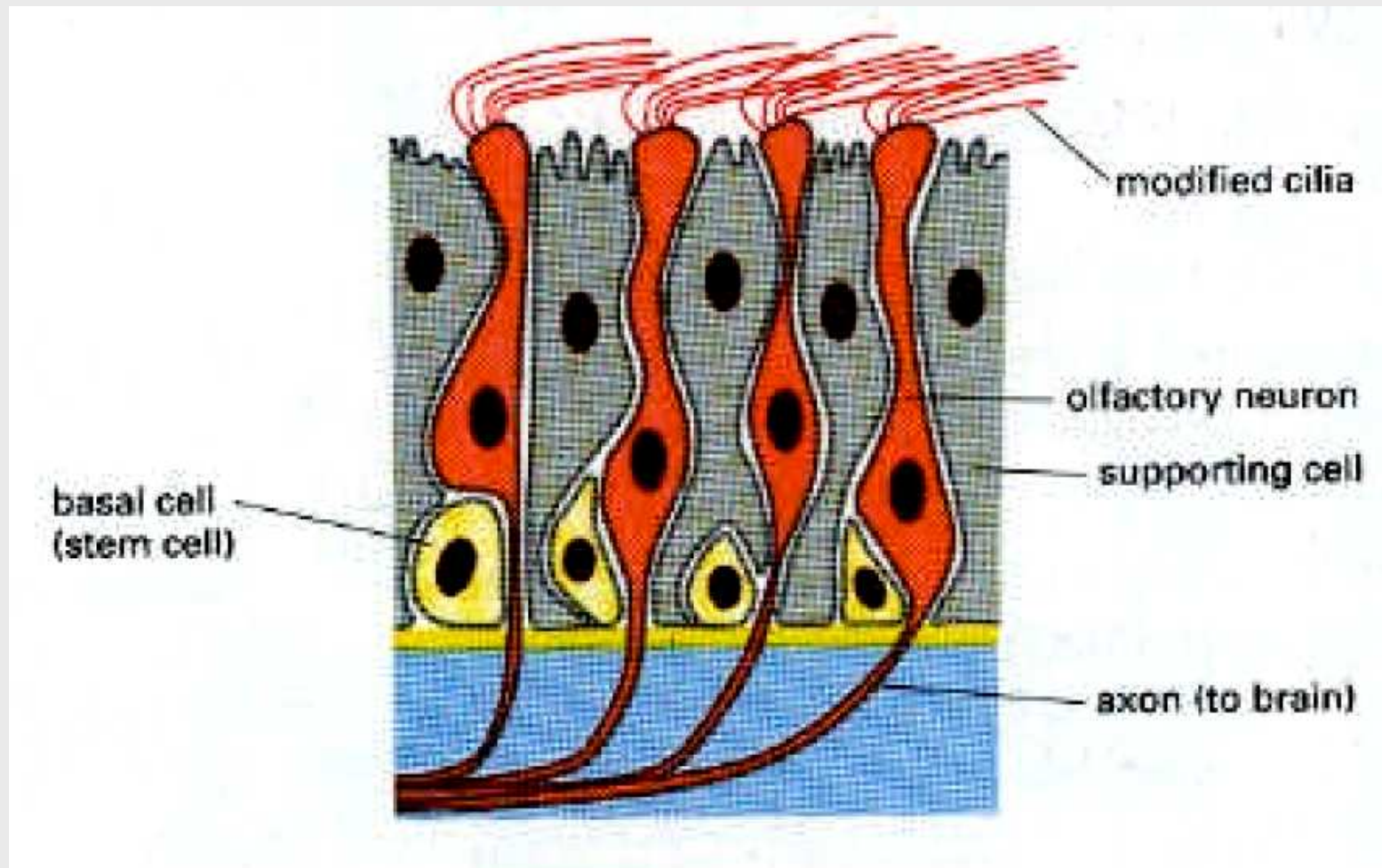
Le fibre malate degenerano e, per compensare, vengono reclutate nuove cellule satelliti
finchè la riserva non è consumata

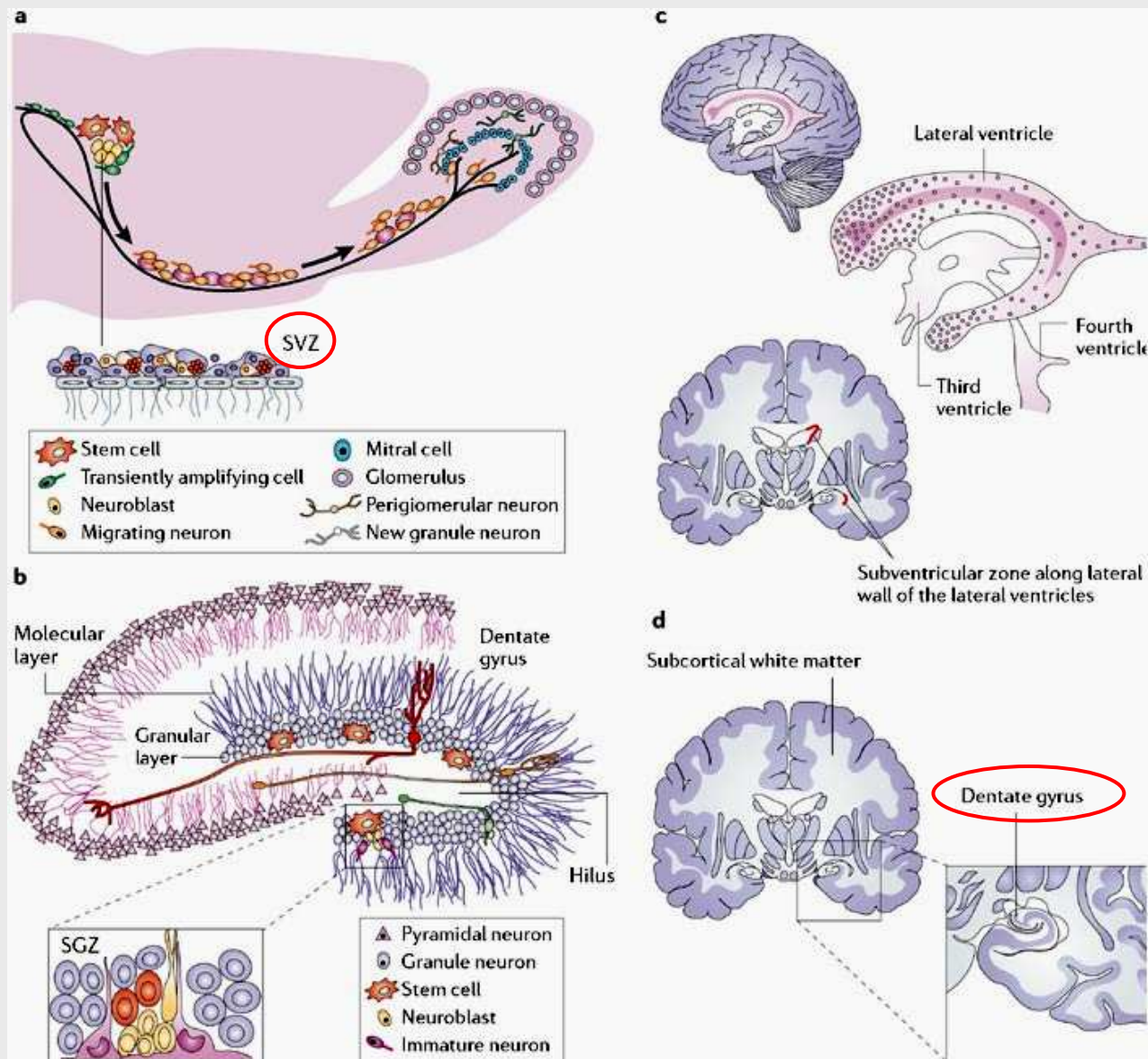


tessuto
sano



Il neurone olfattivo (ZSV) è una cellula con potenziale staminale

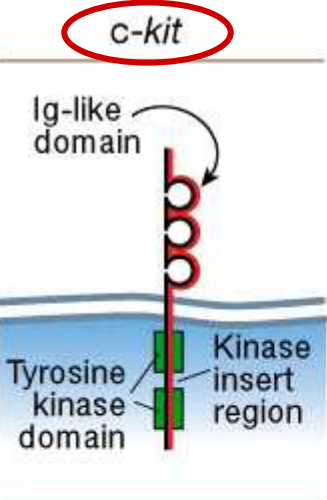
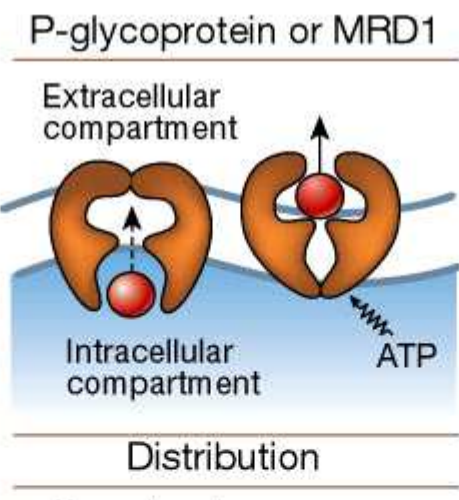
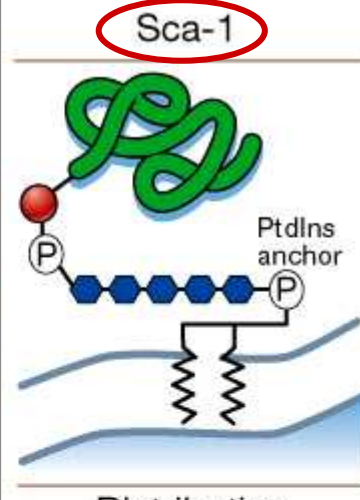




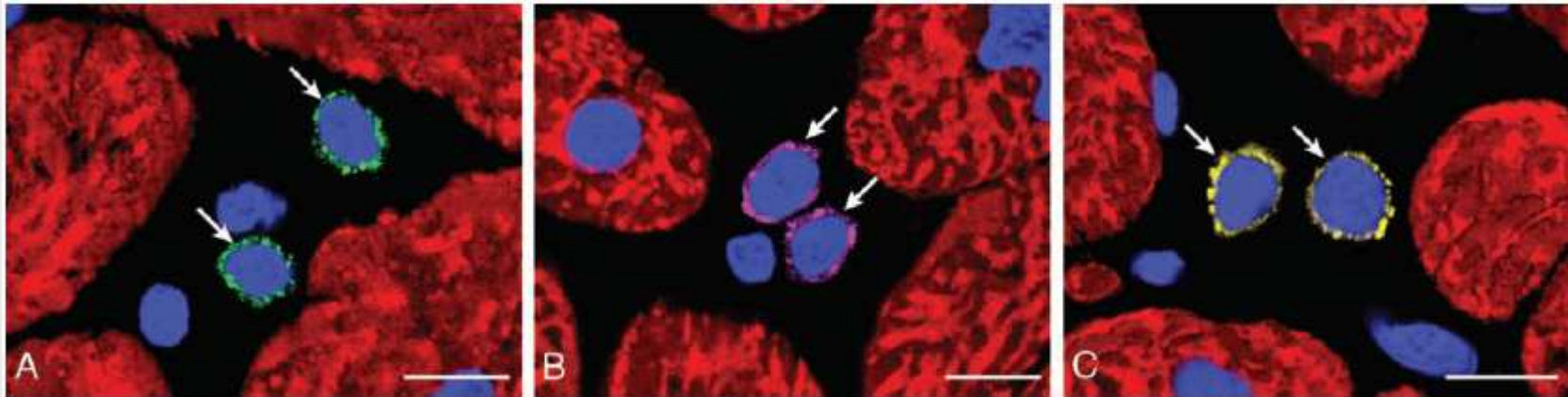
Cellule staminali nel cervello adulto

- Si trovano in due zone:
- Zona sottoventricolare dei ventricoli laterali (dove originano i neuroni olfattivi)
- Zona sottogranulare del giro dentato (integrata con ippocampo)
- Aumentano di numero in caso di danno di organo (exp: neuroni neocorticali che proiettano al talamo). Origine?

Marcatori di cellule staminali

c-kit 	P-glycoprotein or MRD1 	Sca-1 
Distribution • Melanocytes • Mast cells • Germ cells • Stem cells	Distribution • Hepatocytes–cholangiocytes • Brush border cells • Renal tubular cells • Endothelial cells (brain) • Cancer cells • Stem cells	Distribution • Vessel wall • Kidney cortical tubules • Thymus, spleen • T lymphocytes • Stem cells
Functions • Proliferation • Migration • Differentiation • Secretion	Functions • Transmembrane efflux pump • Inhibition of apoptosis	Functions • Cell adhesion • Cell signalling • T-cell activation

Cellule staminali nel miocardio adulto



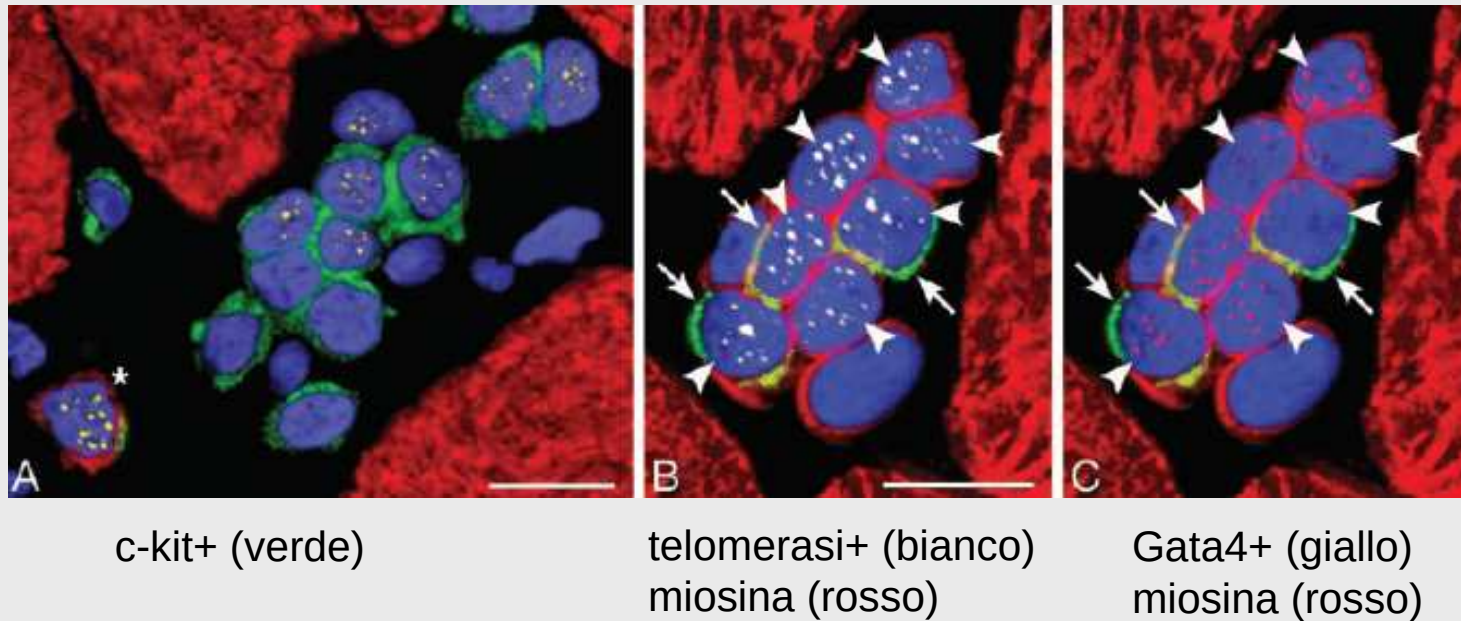
c-kit+

MDR+

Sca1+

Urbanek et al., Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 2003

Cellule staminali nel miocardio adulto che ha subito danno



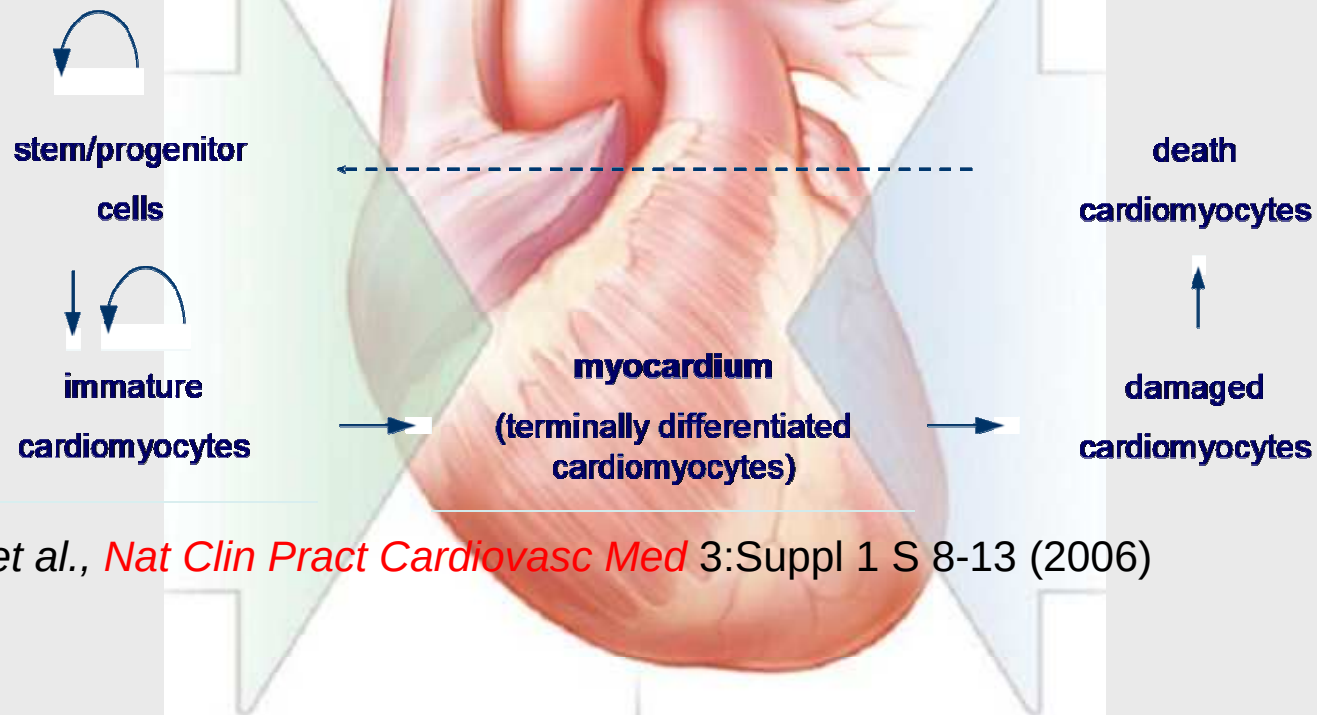
In seguito a danno d'organo proliferano (telomerasi+) e poi si differenziano, acquisendo l'espressione di marcatori miocardio-specifici (GATA4, MEF-2c, alpha-cardiac MHC, laminina)

Urbanek et al., Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 2003

Accrescimento miocardio

- Vita fetale: notevole proliferazione
- Da neonato a adulto: la massa aumenta di circa 30-50x, soprattutto per **ipertrofia** (nella prima decade generate cellule binucleate e poliploidi)
- La duplicazione cellulare generalmente studiata con marcatura del DNA a breve termine mostra livelli bassissimi

Omeostasi dei cardiomiociti



Torella et al., *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3:Suppl 1 S 8-13 (2006)

- I cardiomiociti si rinnovano, con un ritmo che va dal **1%** annuale all'età di **25** anni all'**0.45%** all'età di **75** anni.
- Meno del **50%** dei cardiomiociti sono sostituiti durante la vita.

Bergmann et al., *Science* 324: 98 (2009)

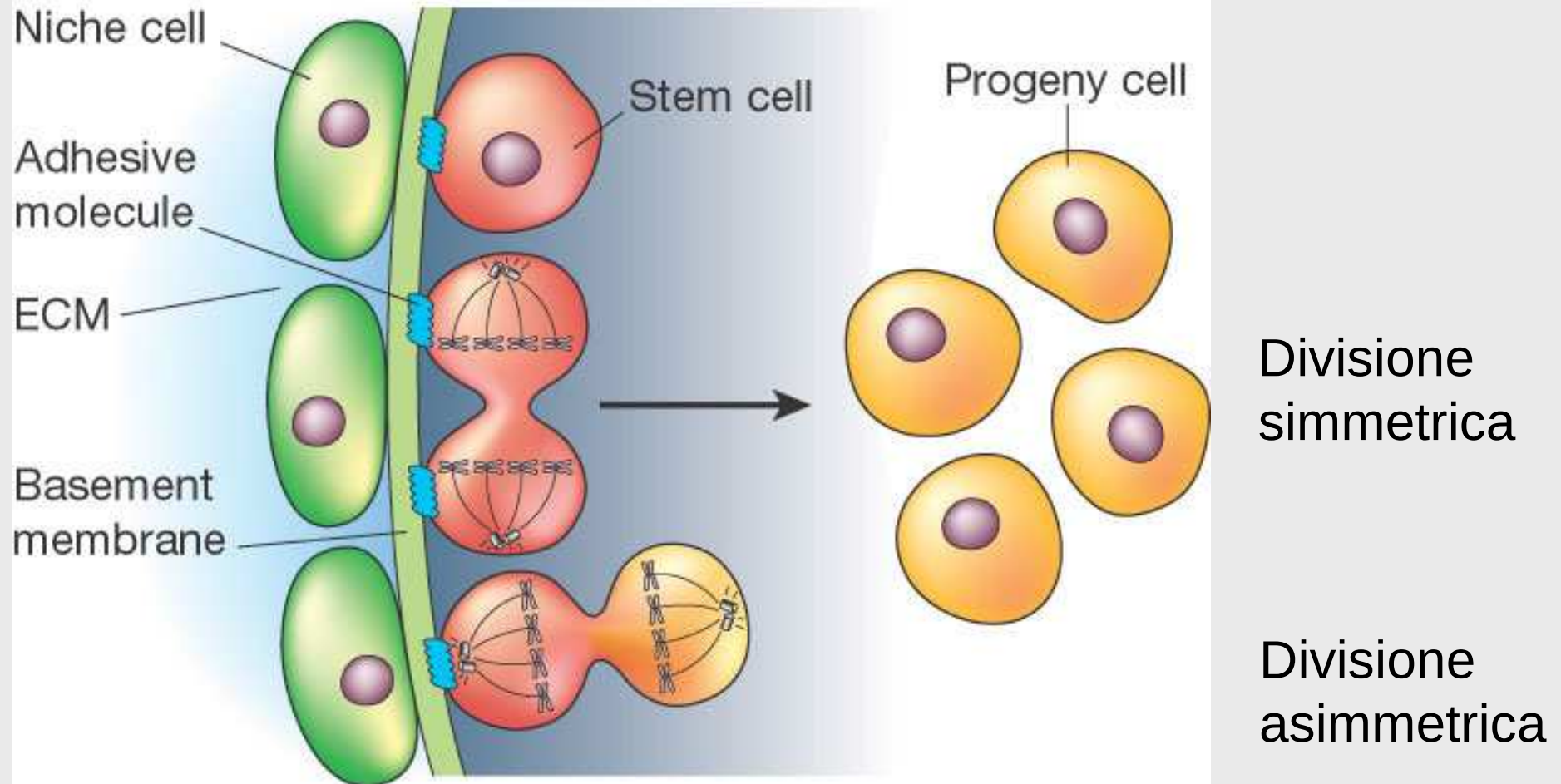
Definizioni delle cellule staminali ES, EG, EC o da adulto

- **Totipotente**: zigote e primi blastomeri (da' origine anche al trofoblasto)
- **Pluripotente**: non toti-potenti perche'non producono tess. extraembrionari)
 - ES Embryonic stem (dall'epiblasto della blastocisti)
 - EG (embryonic germ cell, dalle cellule germinali primordiali)
 - EC (embryonal carcinoma o terarocarcinoma cells)
- **Multipotente** danno origine a molte ma non a tutte le linee maturative (esempi: HSC o MSC) di solito lo sono le **cell. Stam. adulte**
- **Unipotente** danno origine a tutte le tappe (soprattutto prolif. illimitata) di una linea maturativa
- **Progenitore** (telomerasi inattiva, ma non nei topi): numero di divisioni limitate ma potenzialita' differenziative illimitate per un certa linea maturativa
- **Precursore** (per molti sinonimo di progenitore): numero di divisioni limitate e potenzialita' differenziative molteplici ma non illimitate

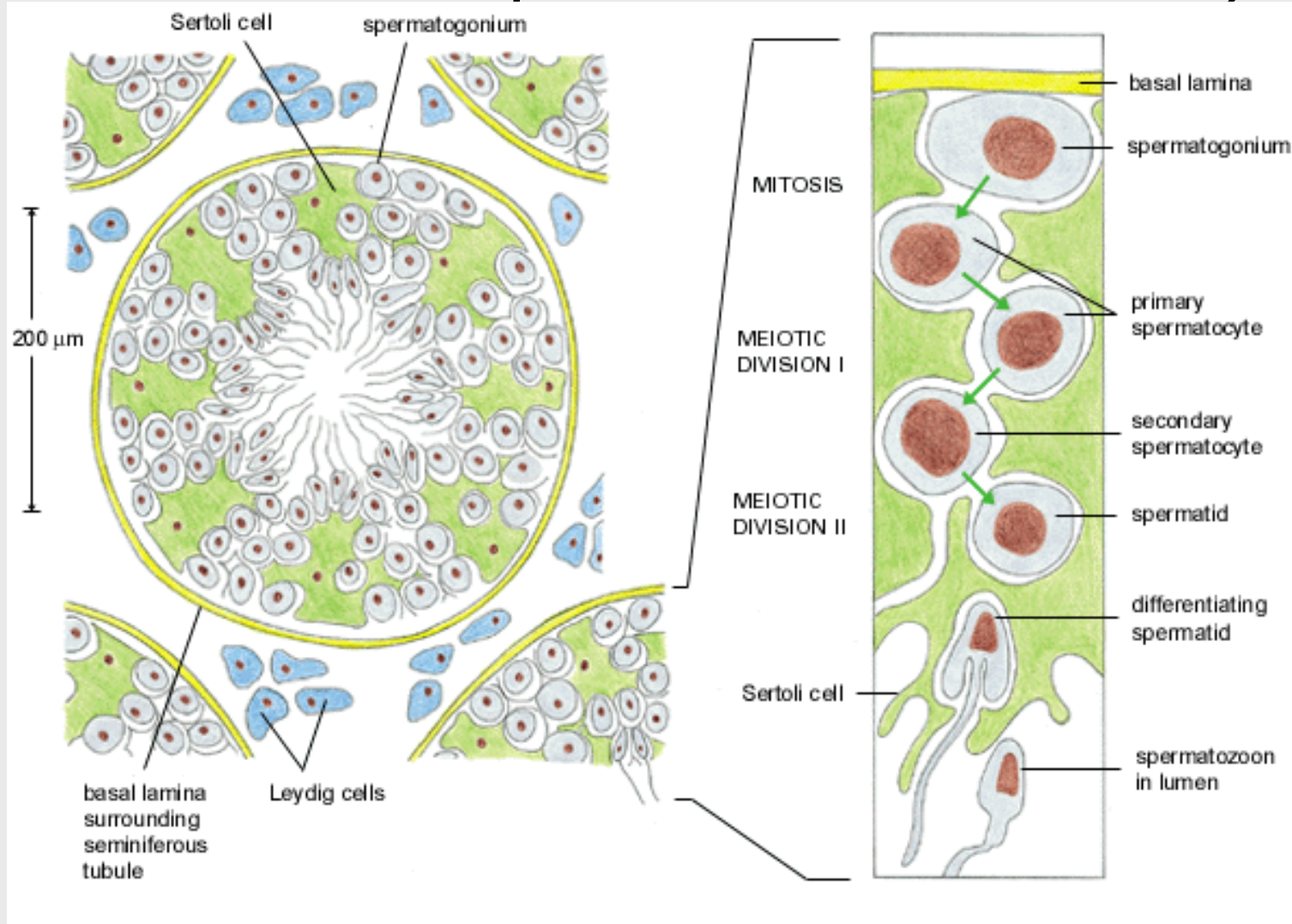
Cellule staminali dell'adulto

- Tessuti diversi ne contengono livelli diversi
- Queste cellule staminali hanno generalmente una potenzialità limitata al tipo cellulare maturo che compone il tessuto/organo
- → il microambiente (nicchia) dà indicazioni sul destino della cellula staminale

Ruolo della nicchia ambientale (nel mantenere staminalità e determinare tipo di differenziamento)



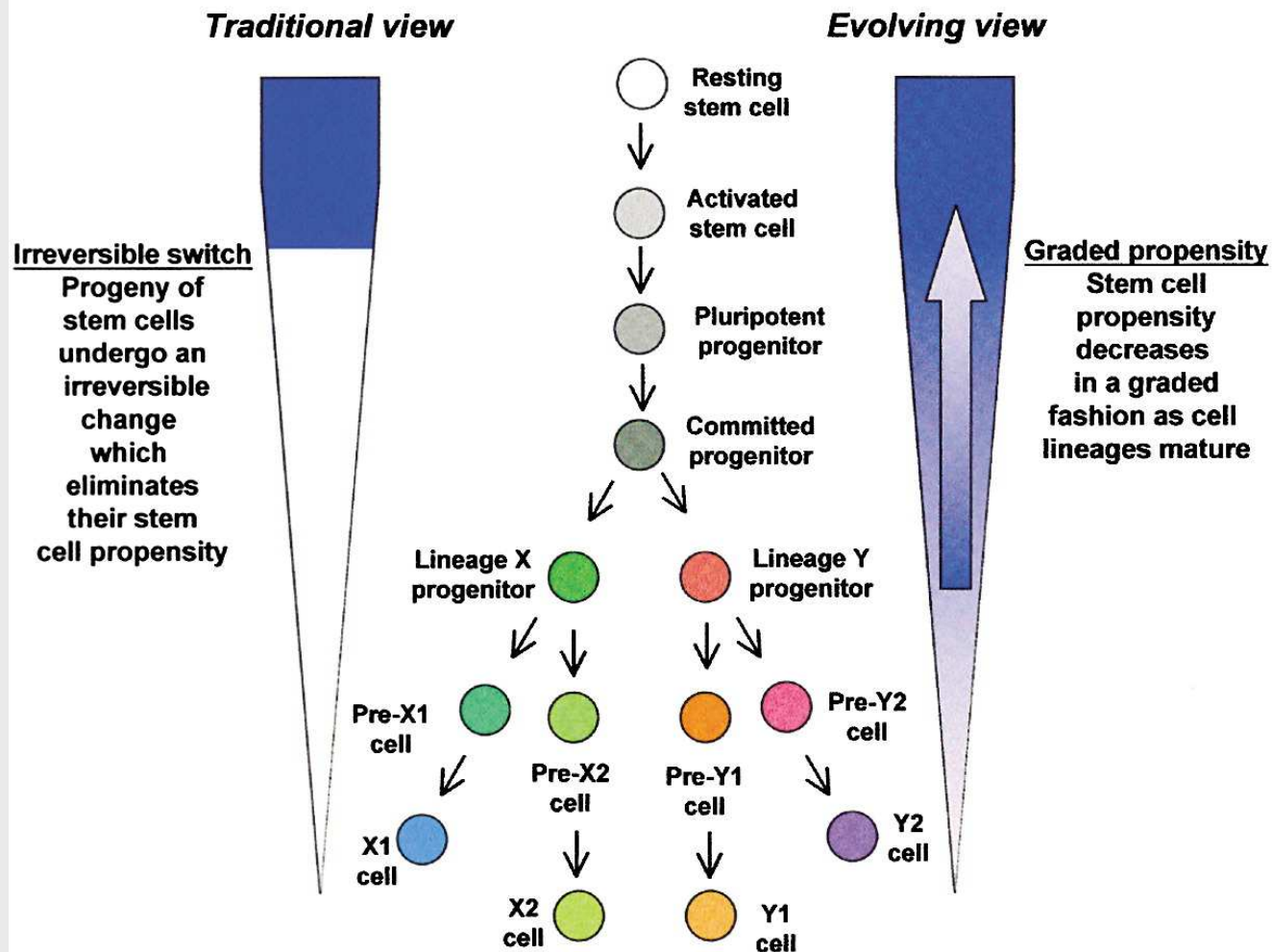
Ruolo della nicchia ambientale (nel mantenere staminalità e determinare tipo di differenziamento)



Curiosita' o utilita'?

Entita' o funzione?

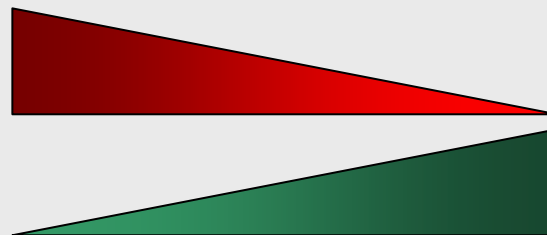
STEM CELL POTENTIALS



Differenziamento fisiologico

- Espressione di pochi dei 30-40,000 geni umani
- Assunzione di un fenotipo specifico (200 tipi di cellule)
- Nessuna alterazione o delezione del DNA (nella gran maggioranza delle cellule)
- Meccanismi **epigenetici ereditabili** (metilazione del DNA, imprinting)
- Memoria molecolare ereditabile attraverso meccanismi epigenetici
- Stabilità del fenotipo
- **NOVITA': Possibilità di riprogrammazione**

potenzialità
differenziamento



Le cellule del midollo osseo hanno grandi potenzialità

- Cellule staminali emopoietiche
- Cellule staminali/progenitori endoteliali
- Cellule staminali mesenchimali
- Cellule progenitrici multipotenti adulte (MAPC)

Bone Marrow = as complex as a forest ecosystem

Nature, 20 may 2005

Altri tessuti con potenziale staminale

- Cordone ombelicale
- Tessuto adiposo → epitelio, osso, tess nervoso, emopoietico, endotelio
- Sangue
- Placenta

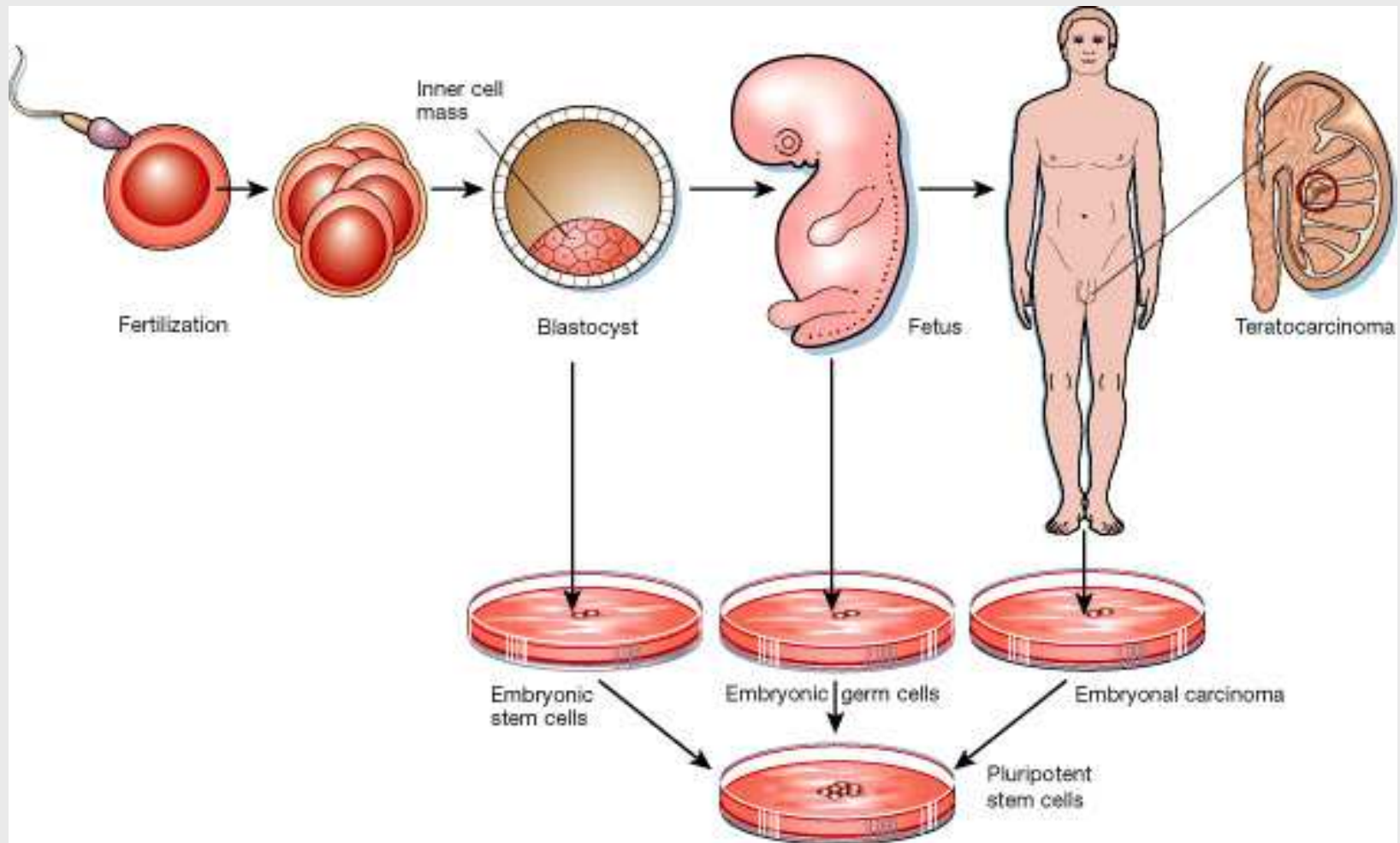
Differenze tra cellule staminali embrionali e adulte

- Pros per le adulte
- Identita' genica, quando possibile
- Le cellule staminali embrionali di topo talvolta danno teratocarcinomi in topi istocompatibili
- Le cellule staminali embrionali umane proliferano meno e si differenziano di piu' di quelle del topo
- Per essere espanse hanno bisogno di condizioni che sono ancora non controllabili (feeder layer)
- Ragioni etiche

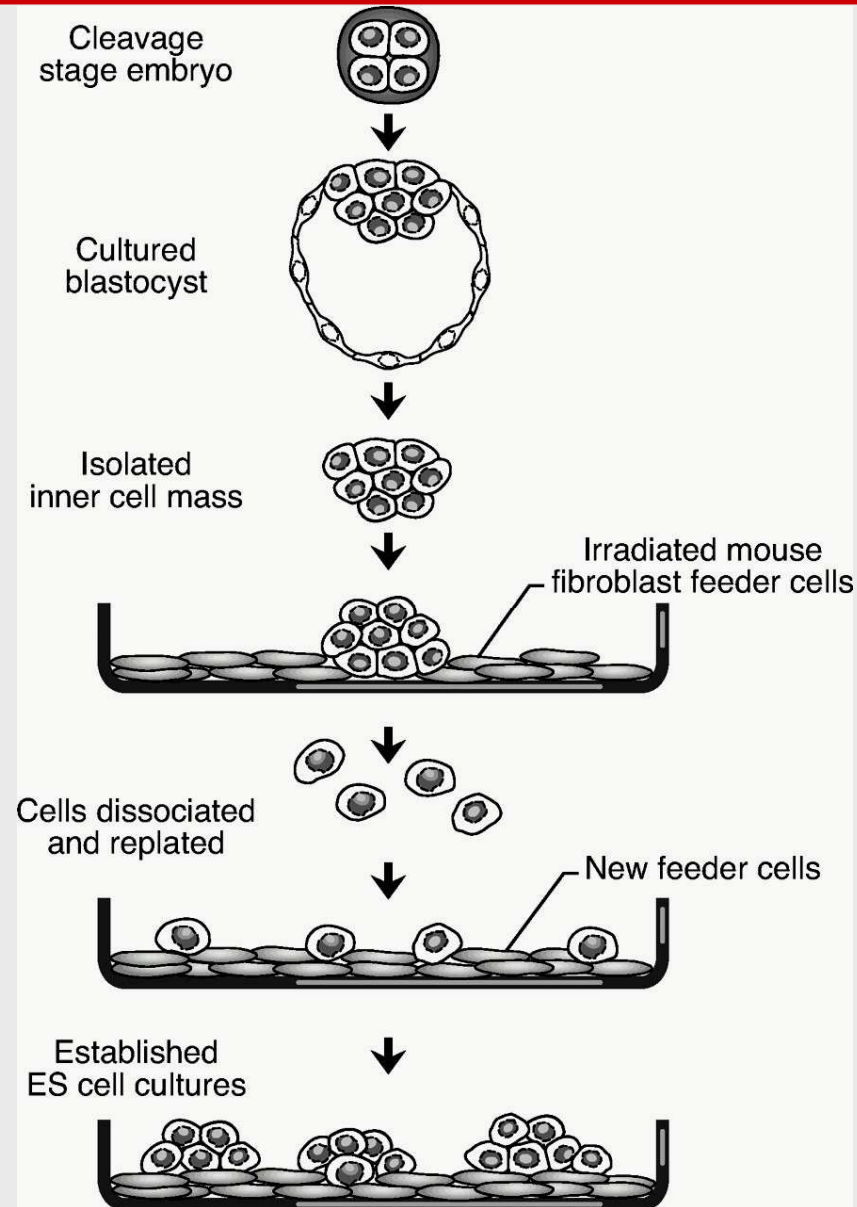
Differenze tra cellule staminali embrionali e adulte

- Pros per le embrionali
- Le adulte sono poche. Oligoclonalita'
- Tipi di cellule differenziate che si possono ottenere dalle adulte: molti ma non tutti e non tutti insieme
- Quantita' di cellule differenziate di ogni tipo che si possono ottenere dalle adulte: poche
- Possibilita' e necessita' di manipolazione (rischiosa) le adulte per ora necessitano di pre-espansione in vitro, marcatura, geni suicidi

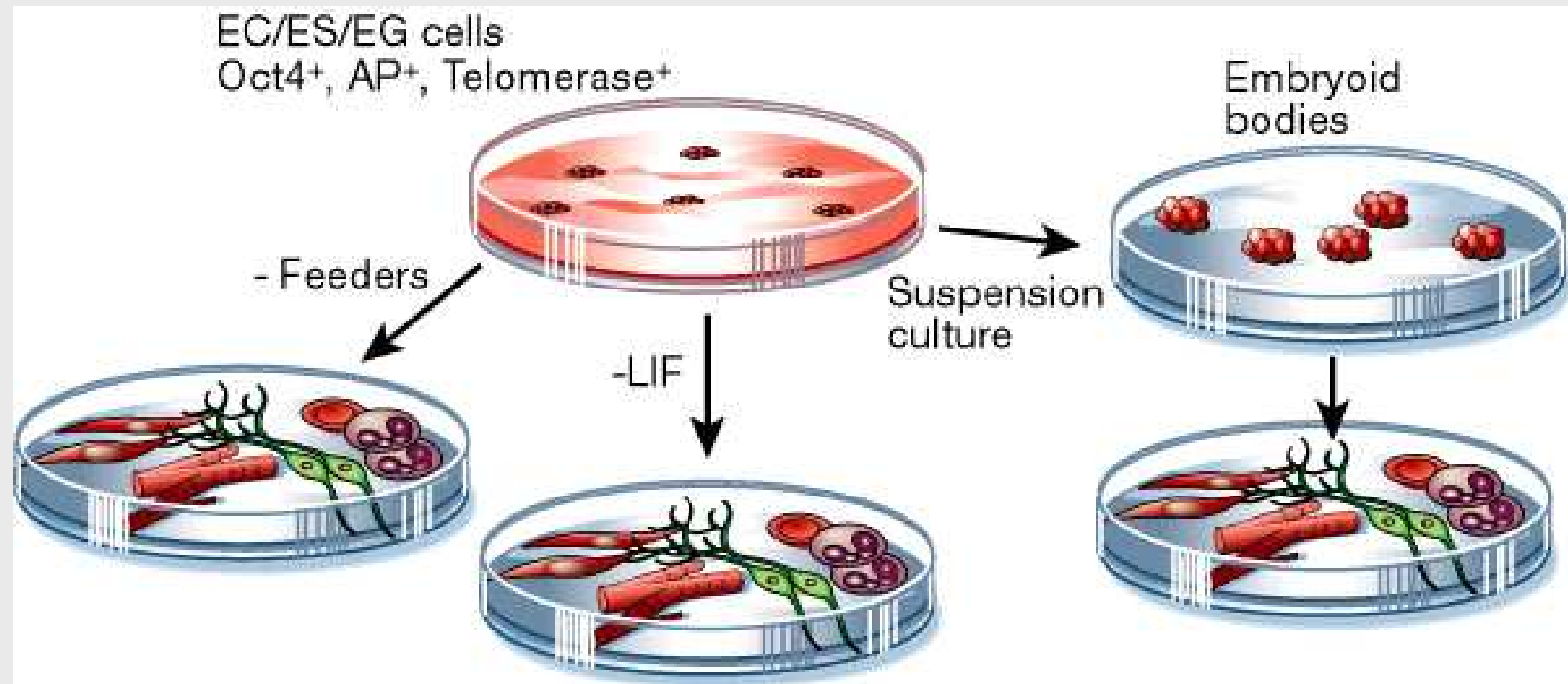
Cellule staminali embrionali



Cellule staminali embrionali



Cellule staminali in vitro



Plasticità delle cellule staminali

- capacità di una cellula staminale tessuto-specifica di dare origine a cellule di linee eterologhe superando i confini linea-specifici.
- Questa proprietà si chiama anche

TRANSDIFFERENZIAMENTO
(fine anni '90)

Plasticità delle cellule staminali

Sorgente cellula donatrice	Tessuto bersaglio	Referenze
Midollo osseo	Muscolo scheletrico Muscolo cardiaco Fegato Cellule endoteliali Cervello	Ferrari et al., 1998 Bittner et al., 1999 Petersen et al., 1999 Shi et al., 1998 Mezey et al., Brazelton et al., 2000.
Muscolo scheletrico	Midollo osseo	Jackson et al., 1999
Cellula nervosa staminale	Sangue Muscolo scheletrico Tessuti embrionali	Bjornson et al., 1999 Galli et al., 2000 Clarke et al., 2000
Cellula emopoietica staminale/arricchita	Muscolo scheletrico Muscolo cardiaco Cellule endoteliali Epatociti Tessuti embrionali	Gussoni et al., 1999 Orlic et al., 2001 Jackson et al., 2001 Lagasse et al., 2000 Krause et al., 2001

Plasticità delle cellule

- cambio di fenotipo delle cellule differenziate
- rideterminazione del nucleo delle cellule somatiche con cambio di spettro di espressione genica
- Riprogrammazione attraverso meccanismi epigenetici

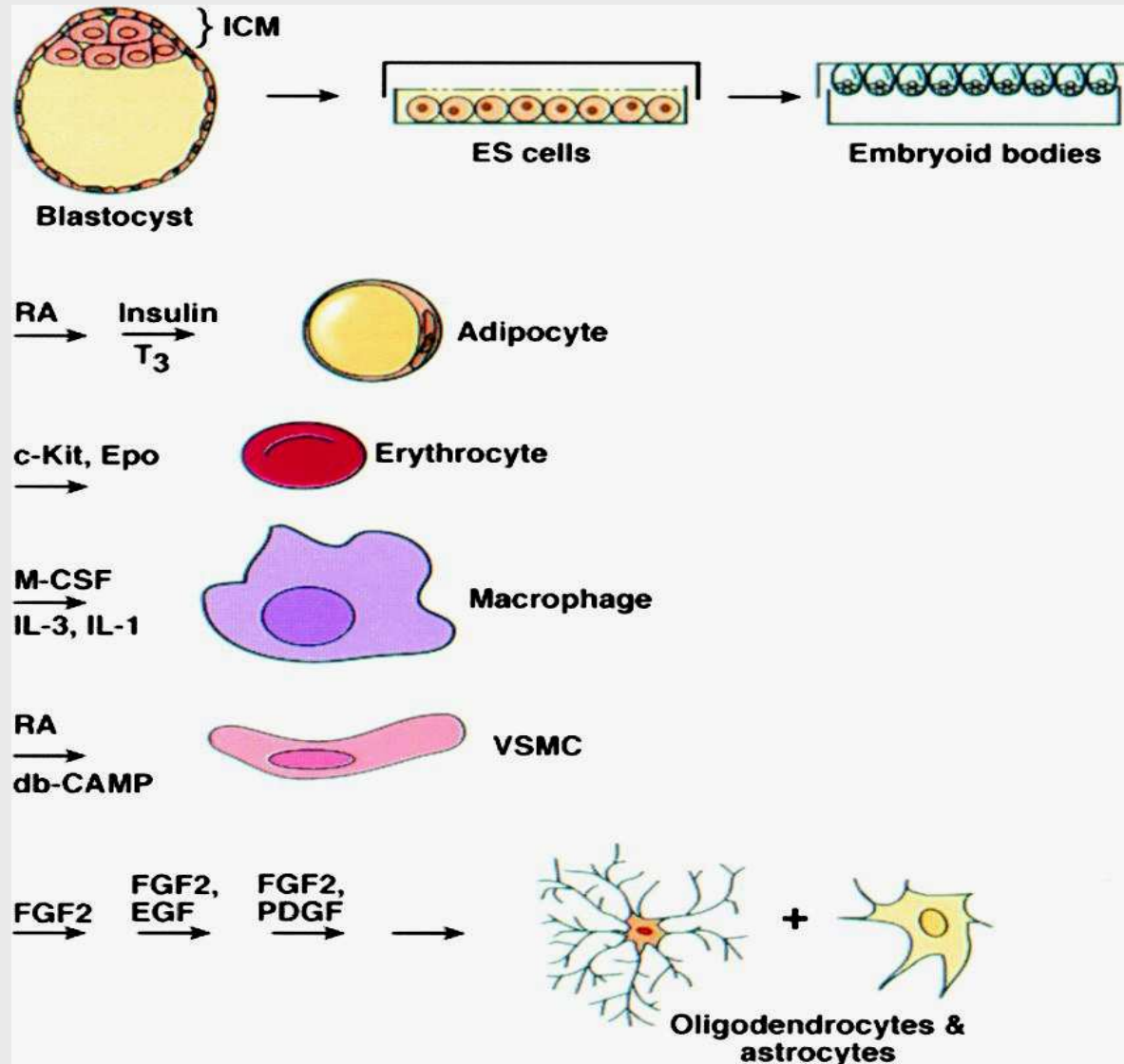
Regolazione del differenziamento

- Memoria molecolare ereditabile attraverso meccanismi epigenetici
- Manipolazione: riprogrammazione del nucleo
 - La “nicchia” ambientale
- Cambio della nicchia, delle proteine di adesione,
- Uso di fattori solubili

Strategia

- Prima le cellule vengono espanse in vitro
- Poi vengono “educate” con opportuni stimoli/segnali ad intraprendere la direzione differenziativa voluta
- Ricapitolare i cambiamenti del microambiente, che caratterizzano il lungo transito da cellula embrionale a tessuto adulto.

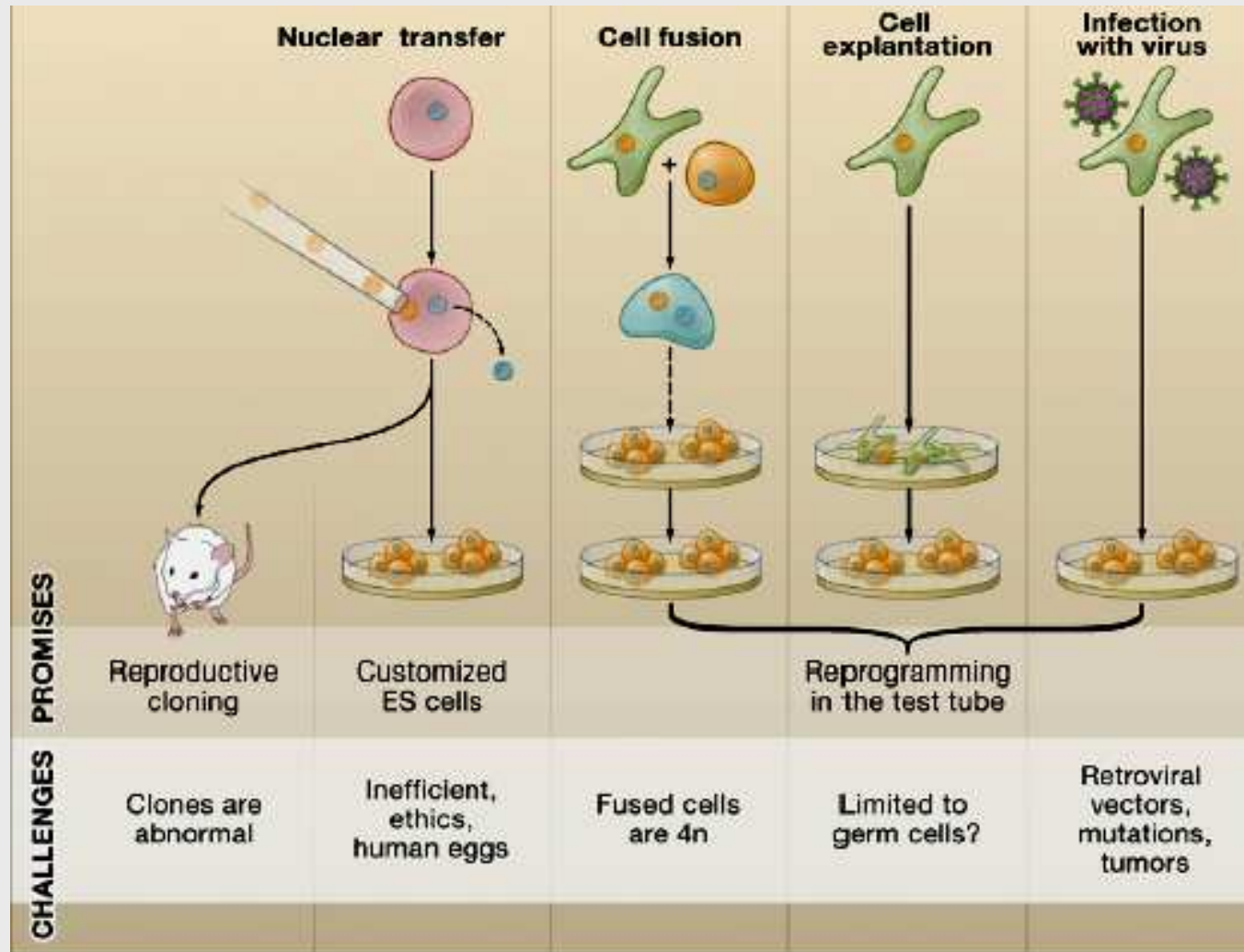
Differenziamento delle cellule staminali



Cellule staminali (problemi)

- Potrebbero diventare tumorali
- Qualora dovessero essere trapiantate, potrebbero essere rigettate, perché non compatibili con il ricevente

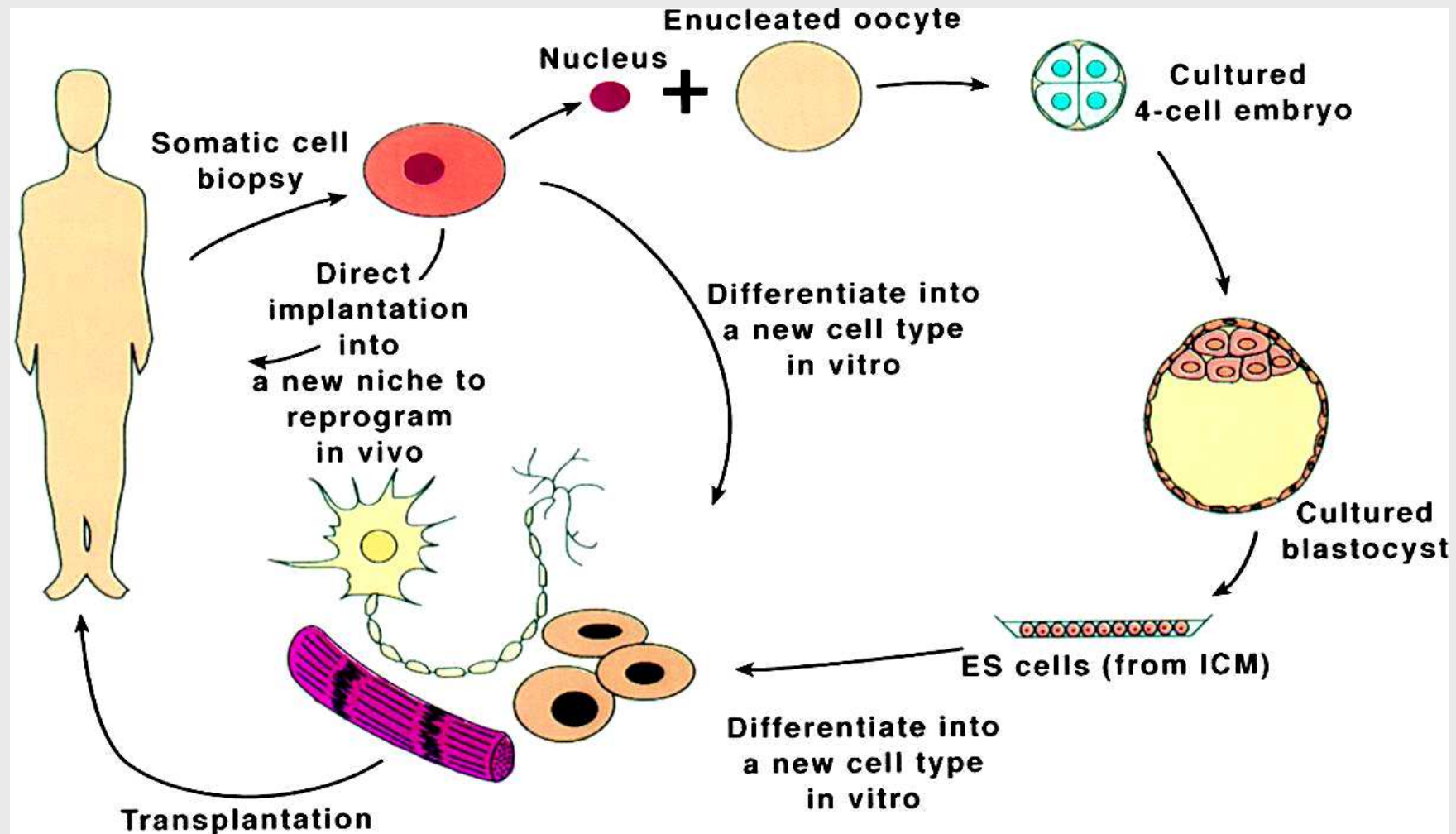
Quattro strategie per riprogrammare le cellule somatiche



Clonazione terapeutica

- procedimento che prevede la generazione di cellule staminali pluripotenti derivate dal paziente, la loro espansione in coltura, differenziazione nell'istotipo necessario e trapianto.
- prevede il trasferimento del nucleo di una cellula somatica matura in un oocita

Terapia con cellule staminali umane (clonazione terapeutica)



Korean Team Speeds Up Creation Of Cloned Human Stem Cells

Nine of the 11 cell lines are derived from people, ranging in age from 10 to 56, who have suffered spinal cord injuries.

another ES cell line, derived from a 6-year-old type 1 diabetes patient,

another one from a patient with hypogammaglobulinemia

Science, 20 may 2005

Queste ricerche sono state smentite
(Riproduzione partenogenetica)

Clonazione riproduttiva

Cumulina con la madre nutrice, la pecora Dolly, gatto, cane, ..



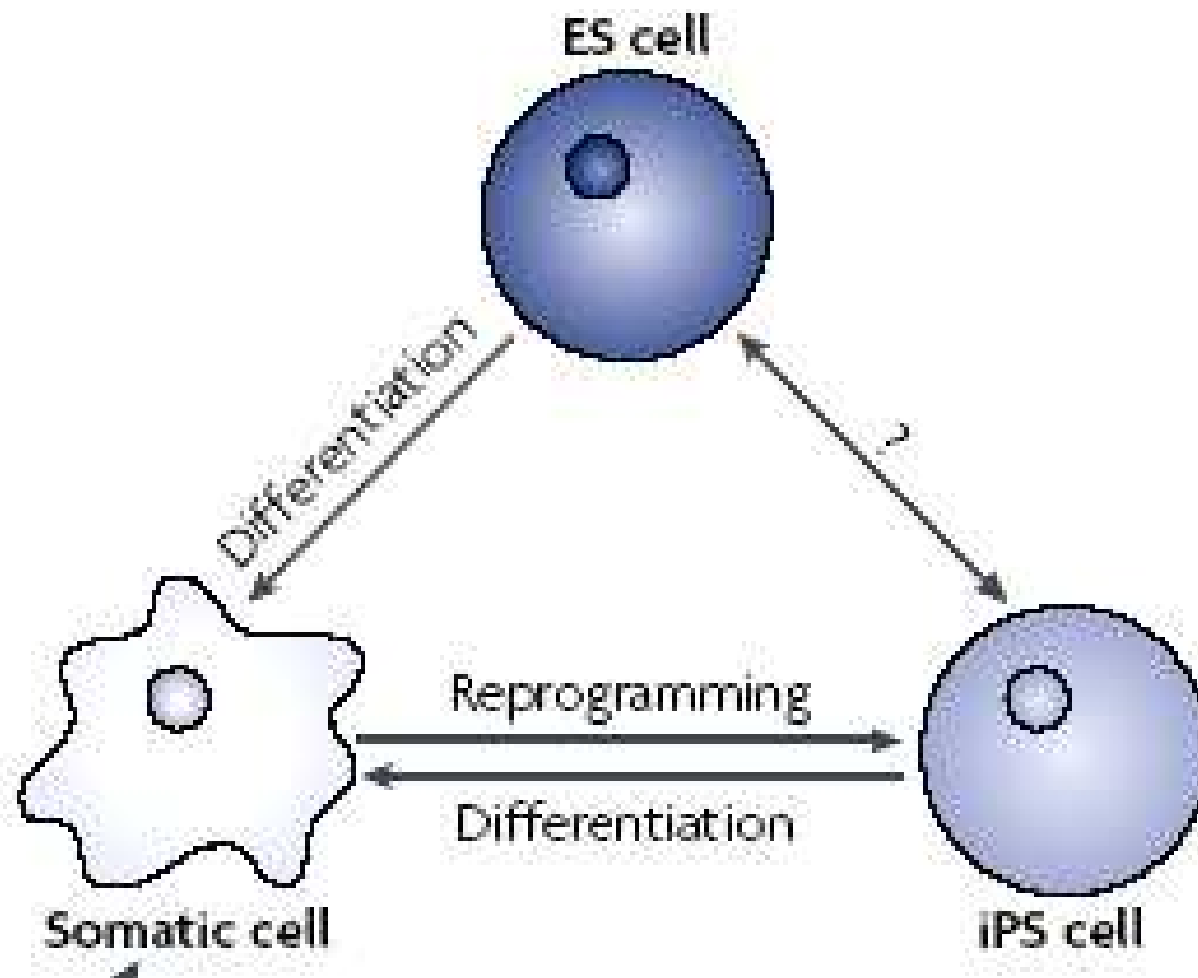
Nature, 23 luglio 1998

Plasticità delle cellule staminali e non solo staminali

- capacità di una cellula staminale tessuto-specifica di dare origine a cellule di linee eterologhe superando i confini linea-specifici.

concetto di TRANSDIFFERENZIAZIONE
concetto di RIPROGRAMMAZIONE

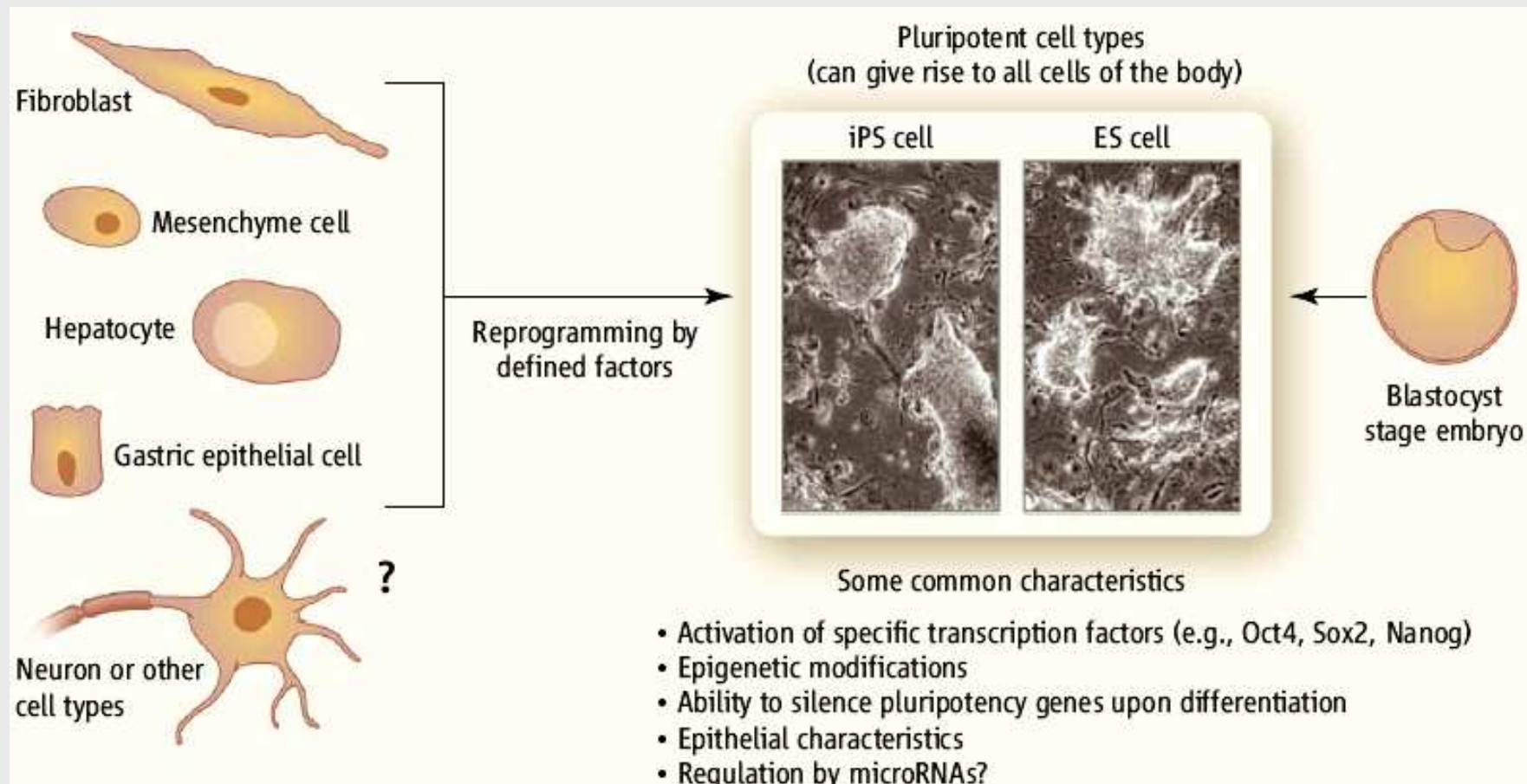
Induzione di cellule staminali pluripotenti (iPS)



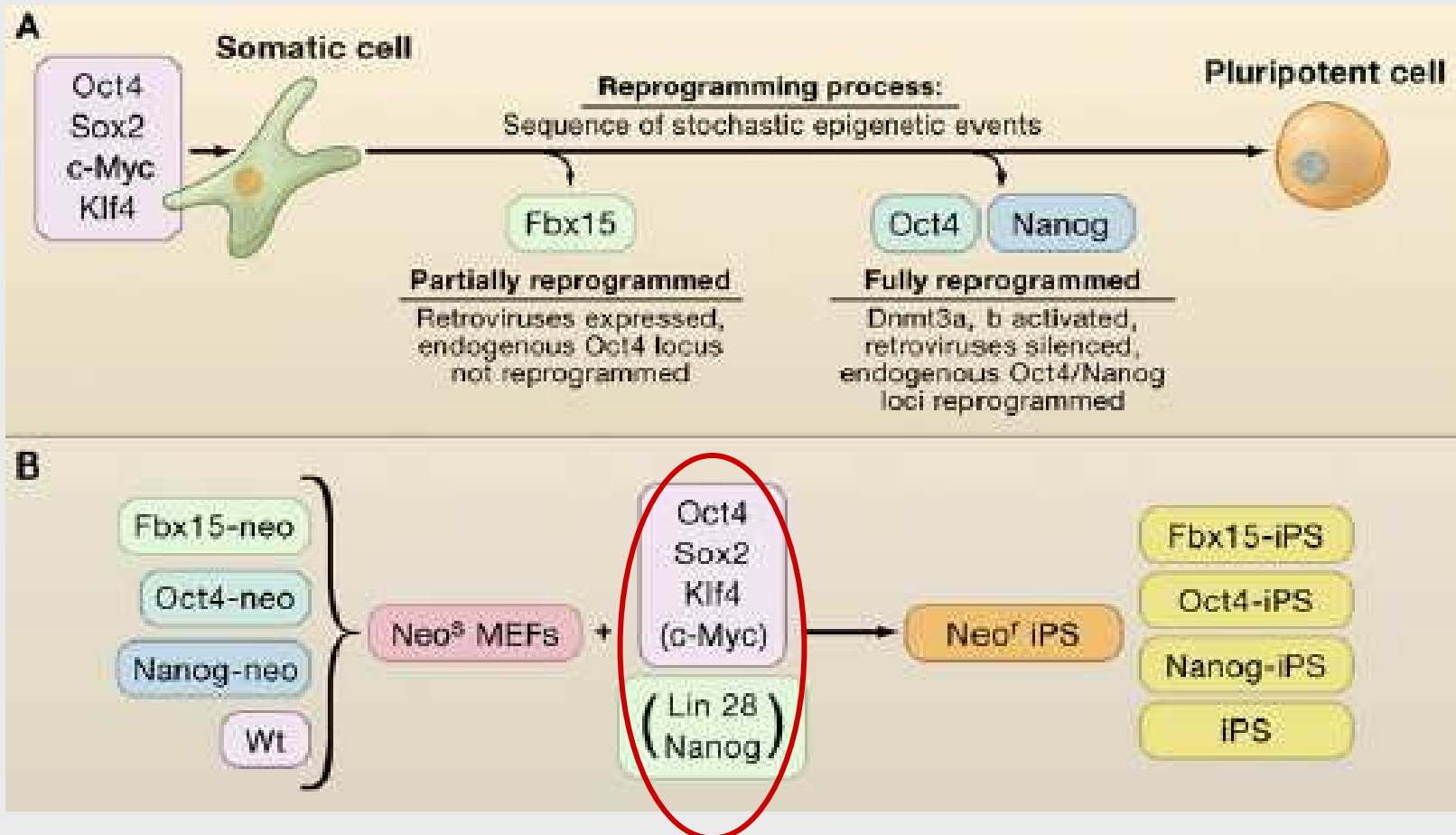
Basi teoriche

- lo sviluppo è condizionato da fattori **epigenetici** più che da eventi genetici → il differenziamento è, in principio, reversibile.
- il trasferimento del nucleo di una cellula somatica nell'oocita permette la riprogrammazione del nucleo somatico a uno stadio non differenziato tramite fattori transattivanti
- → **ricerca di questi fattori**

Induced-Pluripotent Stem Cells (iPSC)



Riprogrammazione di cellule somatiche a uno stato pluripotente (2-4 fattori necessari e sufficienti)



induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)

- Cellule iPS di topo dimostrano essere funzionalmente equivalenti a cellule ES di topo
- Esprimono marcatori ES-specifici, hanno profili di espressione genica simili
- formano teratomi in topi immunoincompetenti
- Contribuiscono a formare tutti i tipi cellulari degli animali chimerici

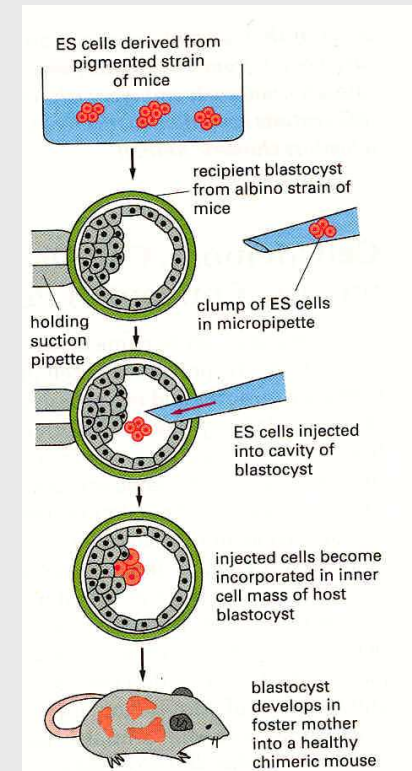
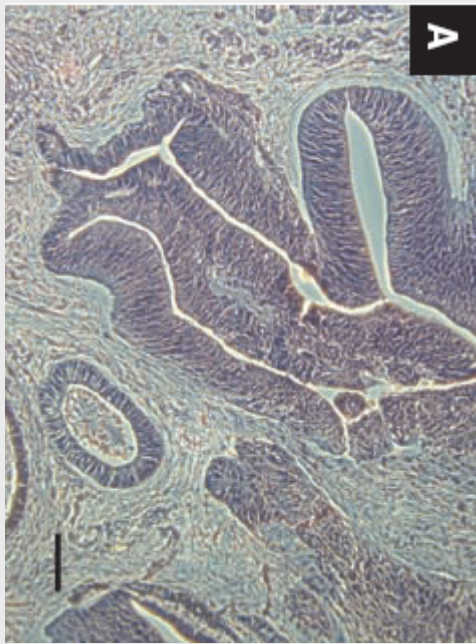
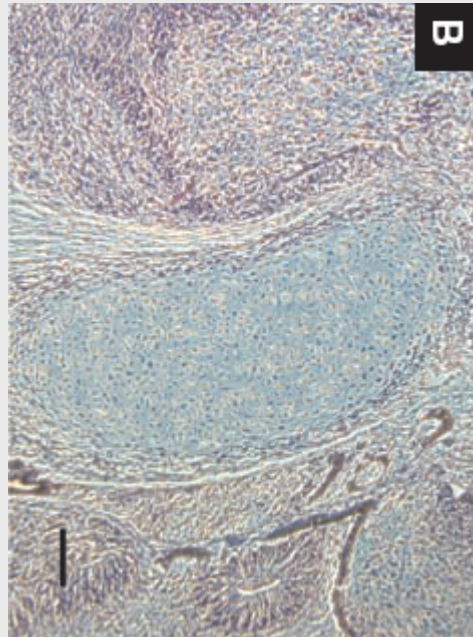


Figure 21-32 Making a chimeric mouse with ES or teratocarcinoma stem cells. The experiment shows that the stem cells can combine with the cells of a normal blastocyst to form a healthy chimeric mouse.

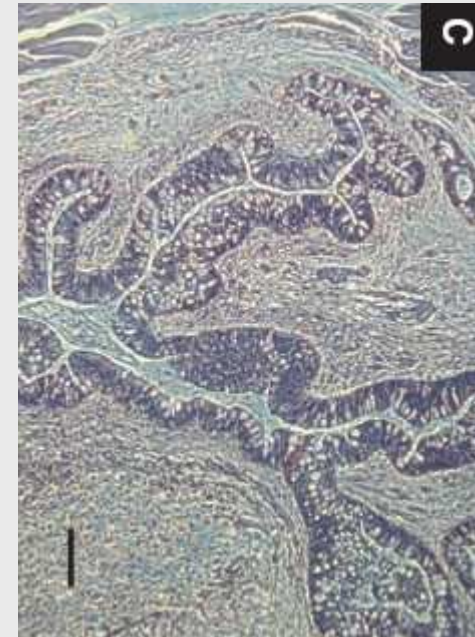
Pluripotenza delle cellule iPS umane (IMR90)



neural tissue



cartilage



gut epithelium

Conclusioni

- Queste cellule iPS umane rispondono ai criteri originariamente proposti per definire cellule ES umane, **tranne che per il fatto che le iPS non derivano da embrioni**
- Si possono usare per studiare lo sviluppo e le funzione dei tessuti umani, per scoprire e testare nuovi farmaci per la medicina da trapianto (→ iPSC paziente-specifiche)
- È necessario lavorare ancora per capire bene come operano i vettori