

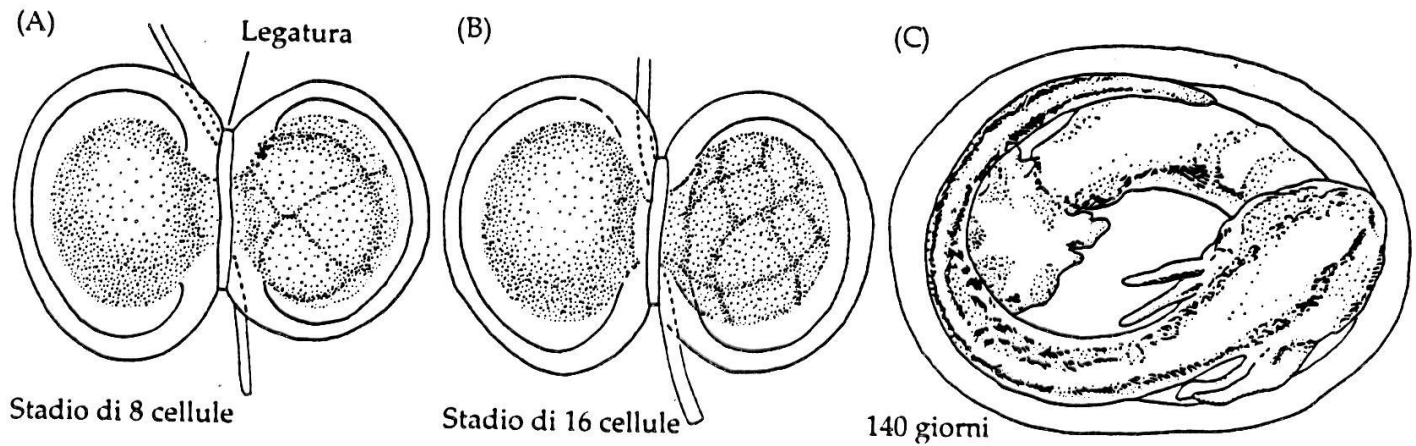
La clonazione e le cellule staminali

Il problema centrale della Biologia dello Sviluppo è quello di comprendere

1. quali meccanismi regolino l'espressione genica differenziale
2. Se è possibile riprogrammare il destino di una cellula matura verso un destino di multipotenza

Riprogrammare il nucleo di una cellula per riacquisire la pluripotenza

Hans Spemann

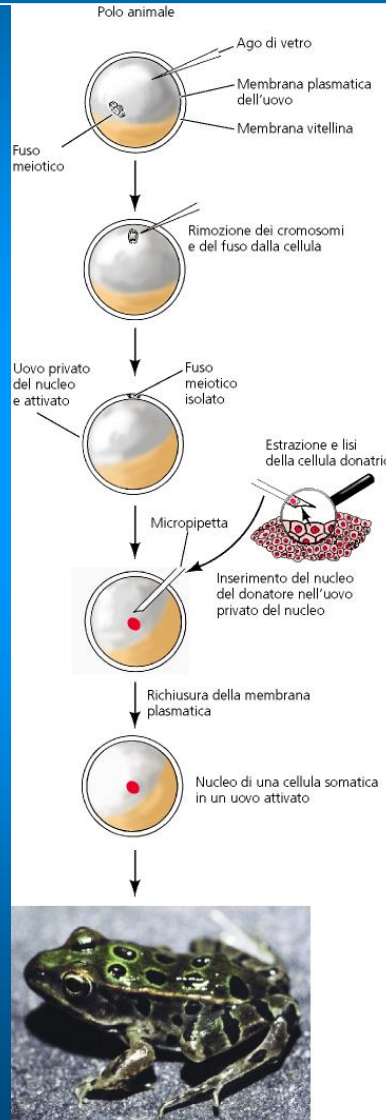


*TRANSPLANTATION OF LIVING NUCLEI FROM BLASTULA CELLS INTO ENUCLEATED FROGS' EGGS**

ROBERT BRIGGS AND THOMAS J. KING

INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH AND LANKENAU HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE, PHILADBLPHIA, PENNSYLVANIA

Communicated by C. W. Metz, March 15, 1952



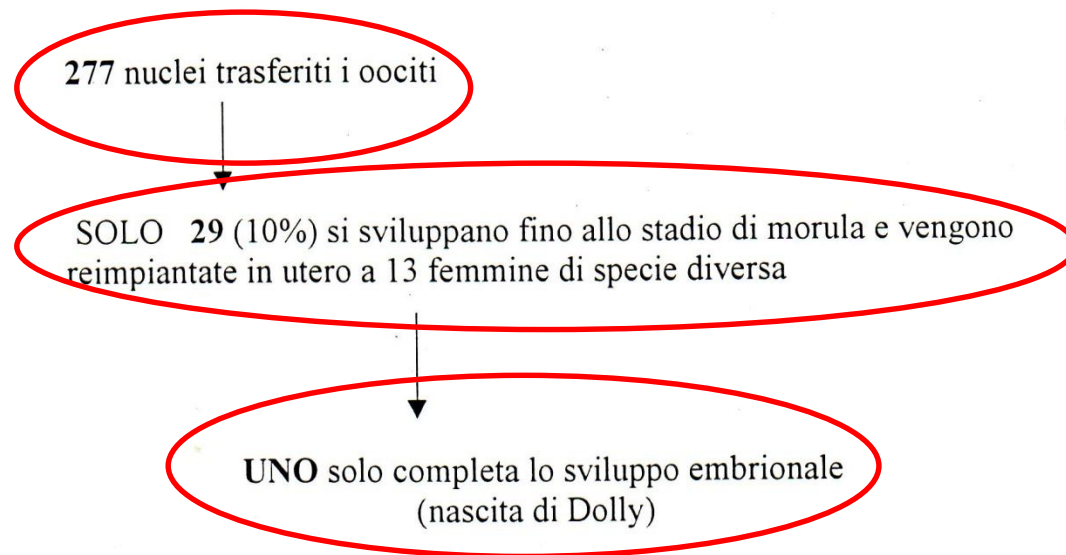


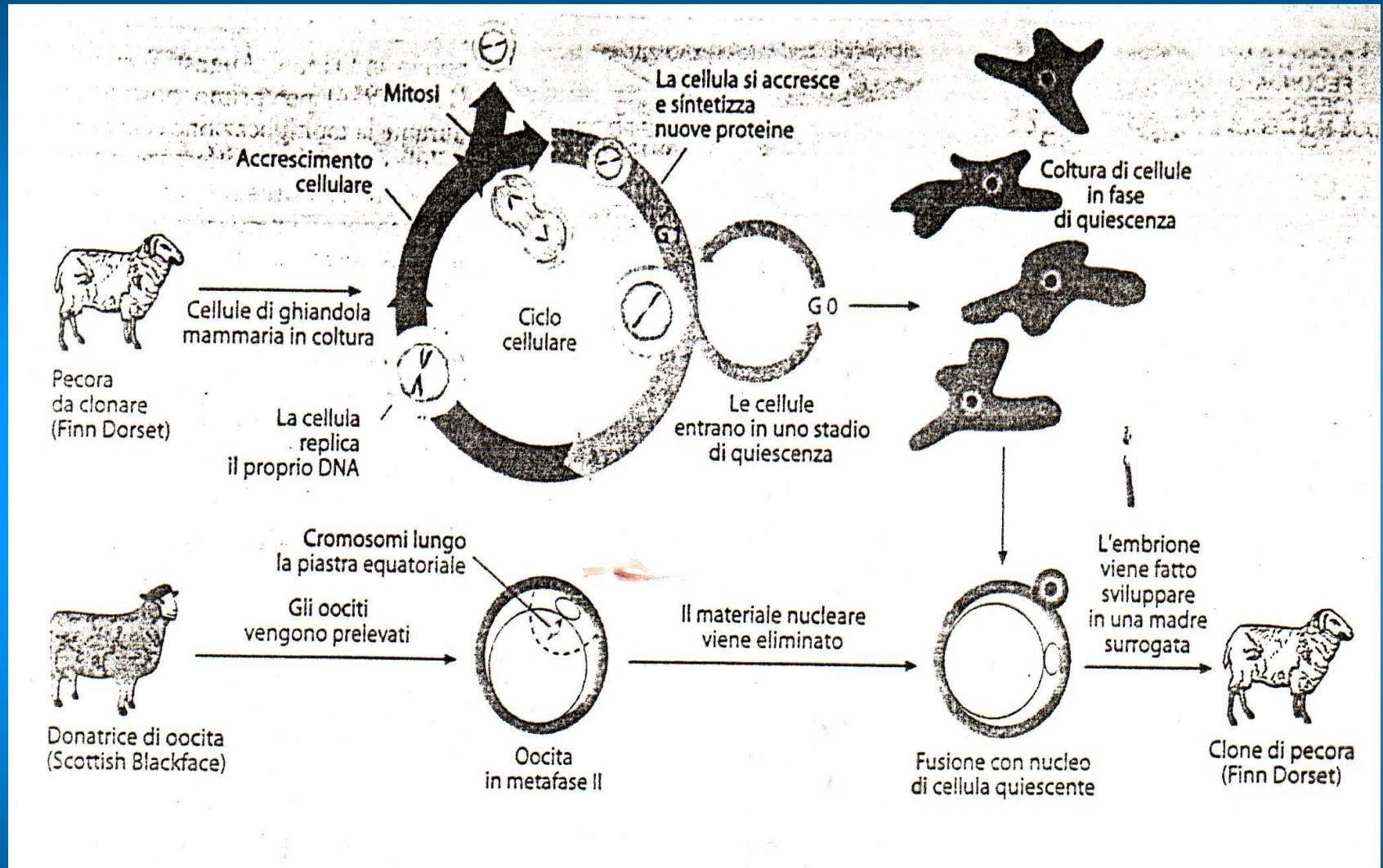
La riprogrammazione dei nuclei di cellule differenziate apre la strada alla clonazione.
La clonazione si pone come metodologia utile a fine terapeutici

Campbell e Wilmut (1996): clonazione della pecora Dolly

- 1) Prelievo di cellule embrionali staminali (blastocisti) ;
- 2) Crescita in coltura
- 3) Trapianto di nuclei in oociti enucleati e reimpianto in utero

- 1) prelievo delle cellule di ghiandola mammaria
- 2) dissociazione e mantenimento in coltura con terreni minimi allo scopo di rallentare la divisione cellulare e bloccarle in Go
- 3) queste cellule portate allo stato di quiescenza vengono fatte fondere con il virus di Sendai che legandosi alla membrana plasmatica ne facilita la fusione con la membrana dell'oocita



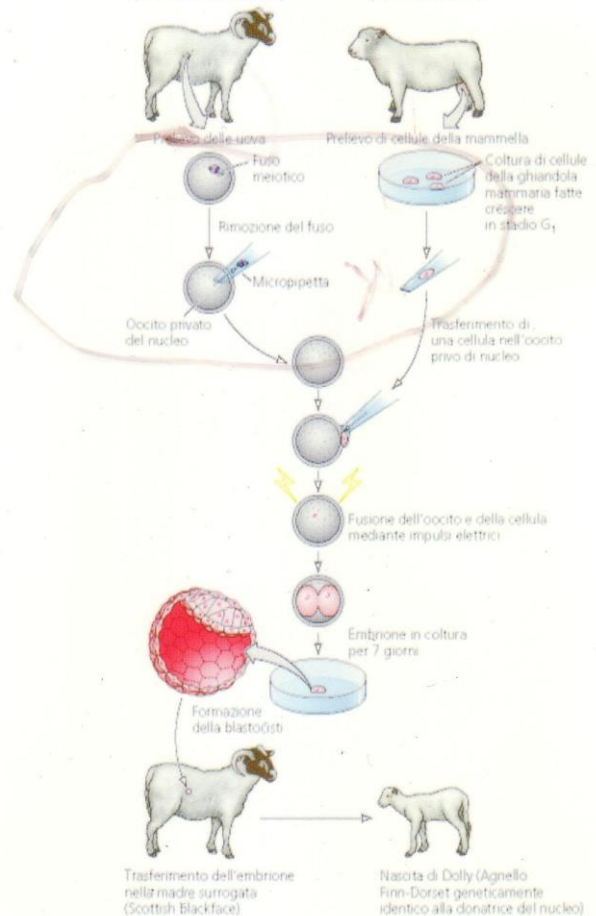




(B)

DONATRICE DELL'OOCITO
(razza Scottish black face)

DONATRICE DEL NUCLEO
(razza Finn-Dorset)



1:277

(0,3%)

La pecora non rappresenta il modello animale migliore per comprendere i meccanismi molecolari che regolano la riprogrammazione di un genoma di una cellula somatica

Le conoscenze di genetica e di Biologia molecolare sono piuttosto limitate

Attivazione del genoma zigotico nella pecora si ha a 16-32 blastomeri (2,5 giorni dopo la fecondazione)

Nel topo a 2 blastomeri (15-20 ore dopo la fecondazione)

Nell'uomo allo stadio di 4 blastomeri.

Yanagimachi et al (Nature 1998) pubblica la clonazione di topolini da trapianto di nuclei somatici

- 1) cellule del cumulo ooforo
- 2) cellule del Sertoli
- 3) cellule nervose



Sono in fase G0
Non si moltiplicano più
Sono differenziate

La pecora non rappresenta il modello animale migliore per comprendere i meccanismi molecolari che regolano la riprogrammazione di un genoma di una cellula somatica

Le conoscenze di genetica e di Biologia molecolare sono piuttosto limitate

Attivazione del genoma zigotico nella pecora si ha a 16-32 blastomeri (2,5 giorni dopo la fecondazione)

Nel topo a 2 blastomeri (15-20 ore dopo la fecondazione)

Nell'uomo allo stadio di 4 blastomeri.

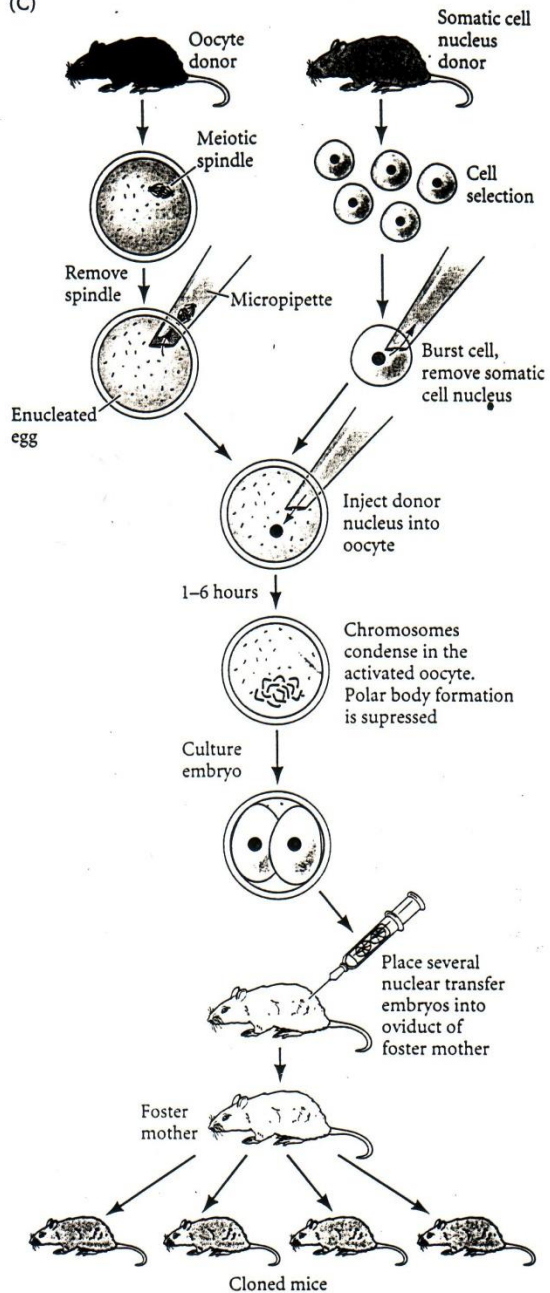
Yanagimachi et al (Nature 1998) pubblica la clonazione di topolini da trapianto di nuclei somatici

- 1) cellule del cumulo ooforo
- 2) cellule del Sertoli
- 3) cellule nervose

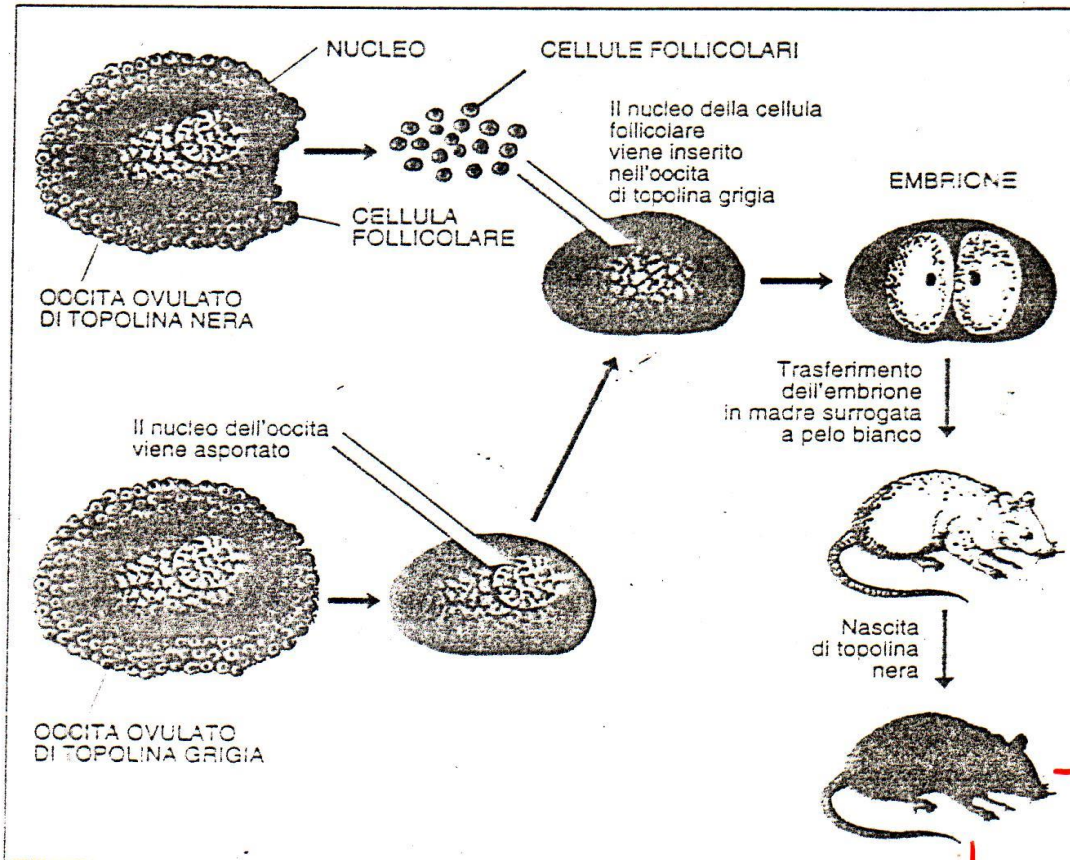
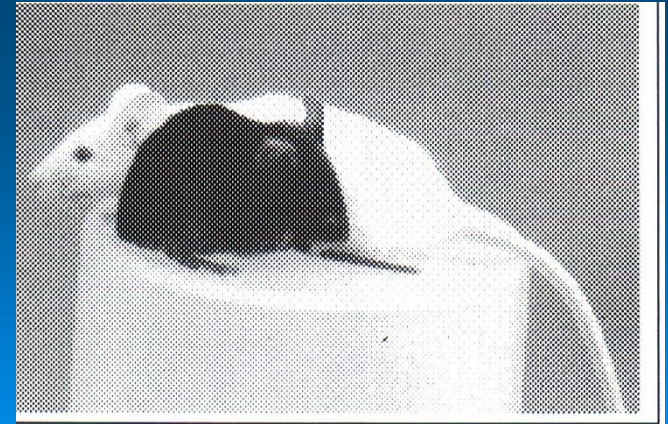


Sono in fase G0
Non si moltiplicano più
Sono differenziate

(C)



CUMULINA



1:84

Ottanta anni dopo gli esperimenti di Spemann arriva la dimostrazione che il genoma di una cellula somatica di mammifero adulto può essere riprogrammato ri-acquisendo la potenzialità di generare un individuo completo

98% degli zigoti ottenuti da trasferimento nucleare non completano lo sviluppo embrionale, ma muoiono nel periodo pre o post-impianto

alterazioni riscontrate negli embrioni abortiti:

- Aneuploidia
- Rottura del DNA (incompatibilità dovuta alla diversa fase del ciclo cellulare del nucleo trapiantato e della cellula uovo)
- DNA mitocondriale somatico nell'embrione (solo in caso di fusione cellulare).
- Attivazione del genoma embrionale (tempi variabili)
- Grado di Metilazione del DNA, acetilazioni istoni,.....

Le tecniche di clonazione rappresentano un traguardo nella comprensione che i nuclei di cellule differenziate sono indiscutibilmente in grado di generare un individuo completo (equivalenza del genoma).

La sua totipotenza viene riacquisita in seguito ad una vera e propria ri-programmazione del nucleo da parte del citoplasma della cellula uovo.

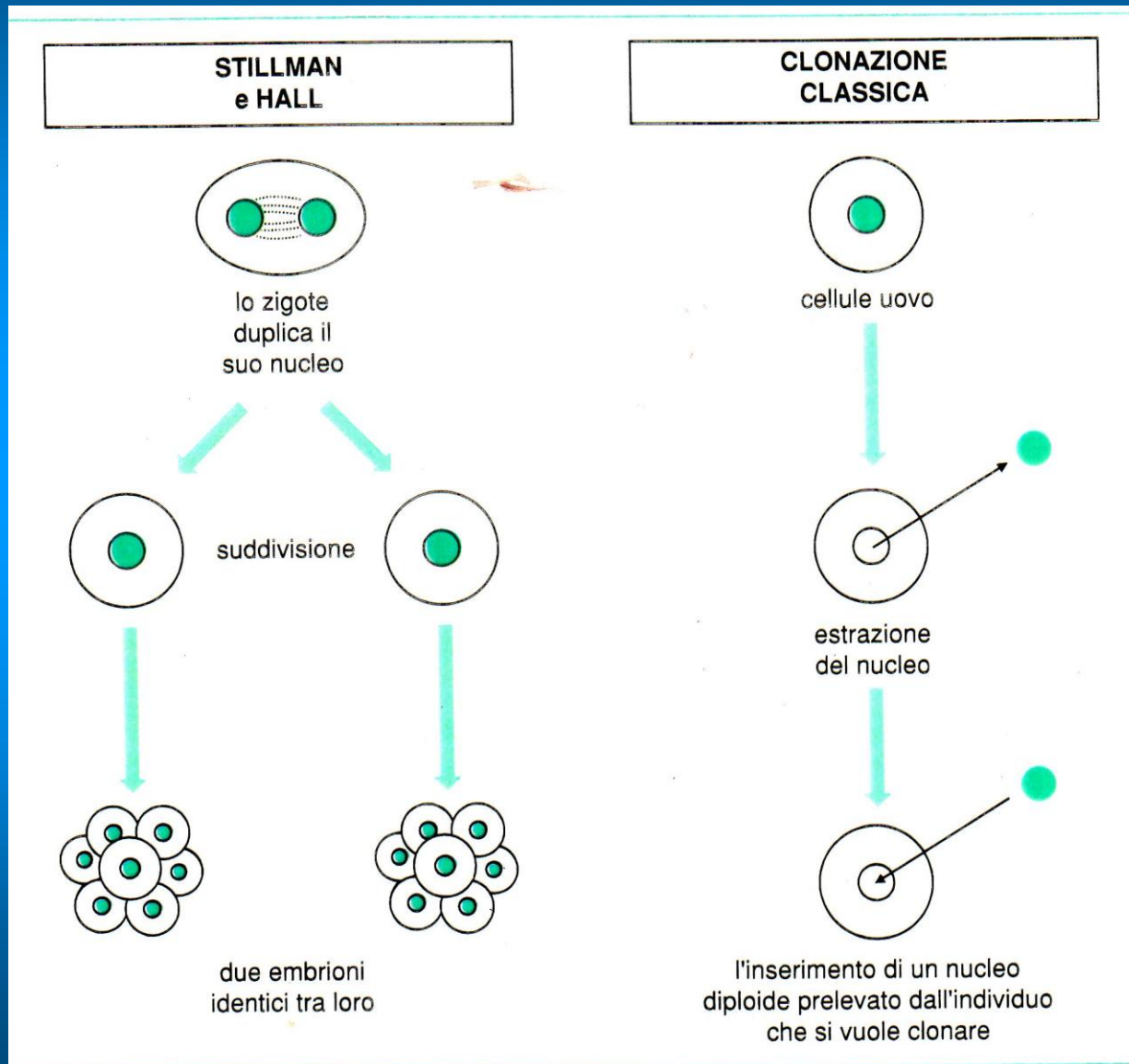
Tali conoscenze aprono prospettive nel campo delle applicazioni zootecniche

L'eventuale applicazione in campo biomedico è ancora fortemente dipendente dalla comprensione dei sottili meccanismi molecolari che regolano tale fenomeno.



**Applicazione in campo zootecnico ad es.
per selezionare specie produttrici di ottima
qualità di carni o di latte**

FISSIONE GEMELLARE – EMBRYO SPLITTING



Applicazione in campo biomedico

- **Maiali transgenici (per molecole del maggior complesso di istocompatibilità umano) clonati (per trapianti di organi)**
- **Per produzione di cellule staminali compatibili con l'individuo donatore**

Le cellule staminali sono attualmente al centro dell'interesse di molti ricercatori per via delle straordinarie potenzialità che queste cellule possiedono per applicazioni in campo biomedico. Sono caratterizzate da due importanti proprietà:

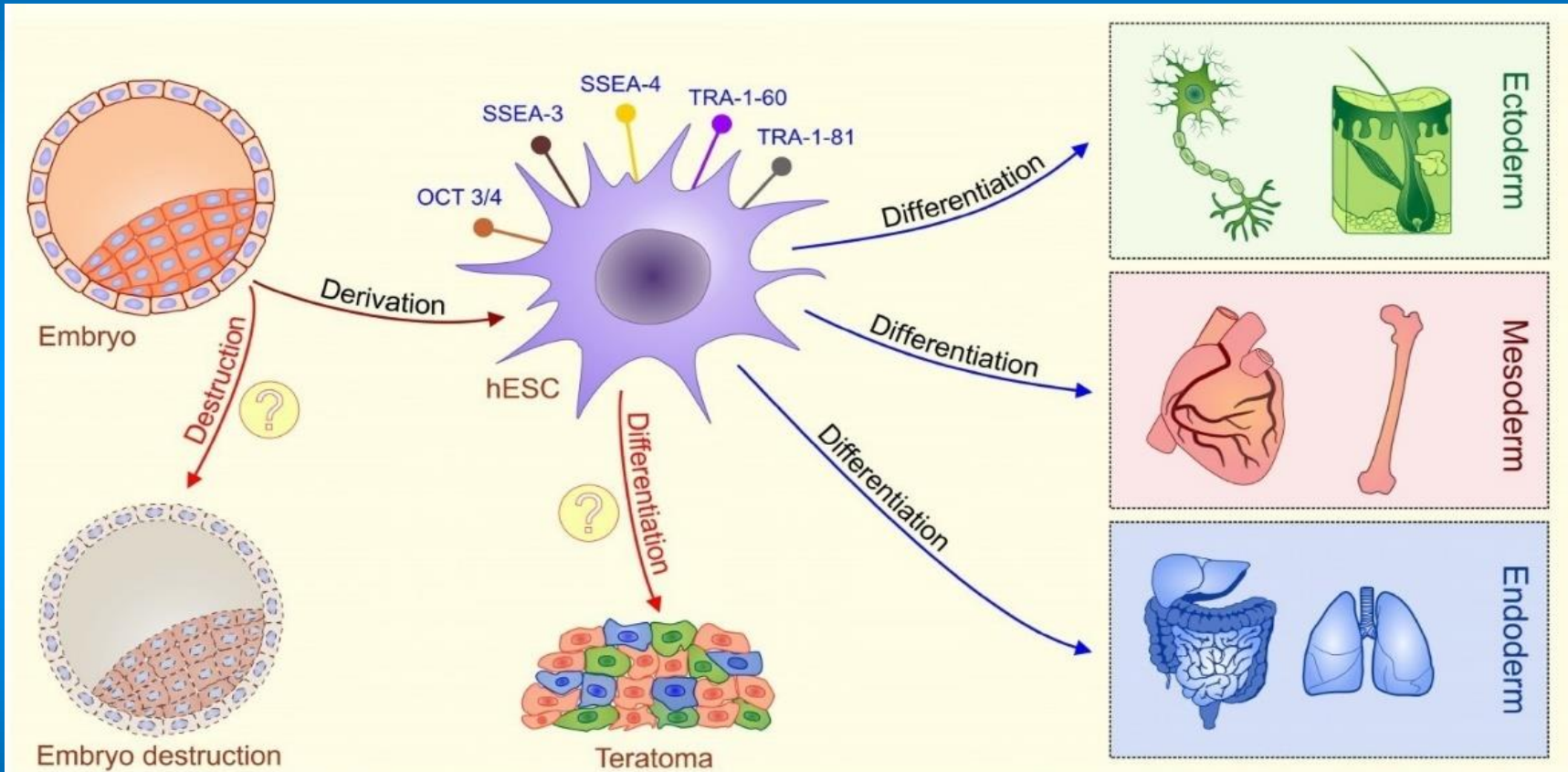
- Capacità di auto-rinnovamento
- Capacità differenziativa

CELLULA STAMINALE:

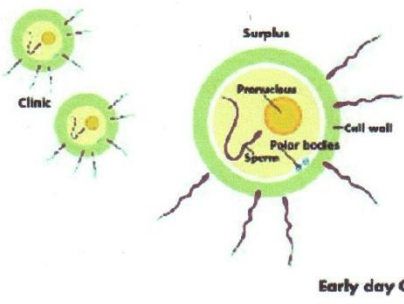
- a) cellule con capacità proliferativa e in grado di mantenere uno stato indifferenziato;
- b) quando indotte a differenziare possono costituire un preciso tipo cellulare;
- c) possono essere quiescenti;
- d) dare origine a divisioni asimmetriche;
- e) pluripotenza

- 1) Cellule staminali in un individuo adulto assicurano il rinnovo dei tessuti. Poiché sono in grado di differenziarsi in un unico tipo cellulare esse sono dette ***UNIPOTENTI***
- 2) Le cellule dei tre foglietti embrionali poiché in grado di generare un numero più ampio di derivati tissutali sono dette ***MULTIPOTENTI***
- 3) Le cellule del nodo embrionale, poiché in grado di generare tutti i tessuti dell'embrione sono dette ***PLURIPOTENTI***
- 4) Lo zigote è invece una cellula ***TOTIPOTENTE***

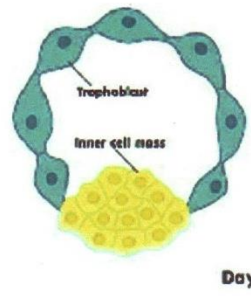
Cellule staminali embrionali



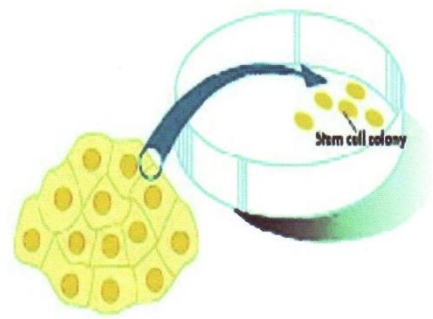
In Vitro fertilized embryo



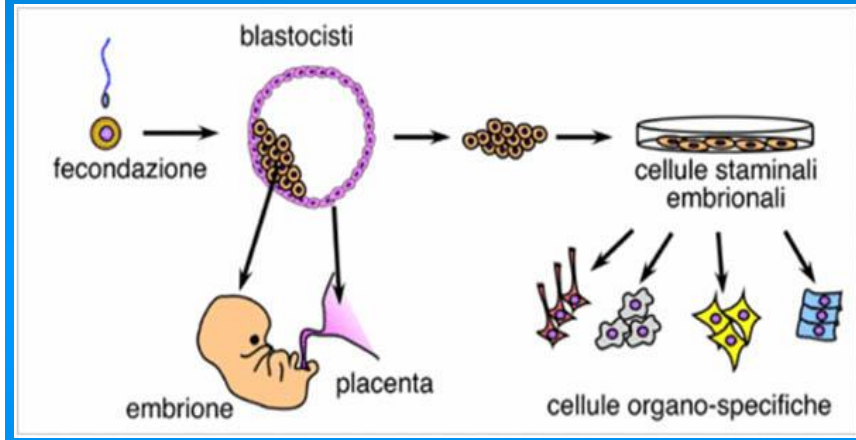
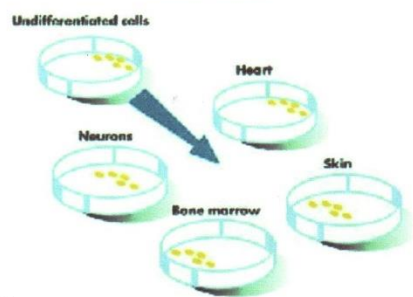
Late blastocyst



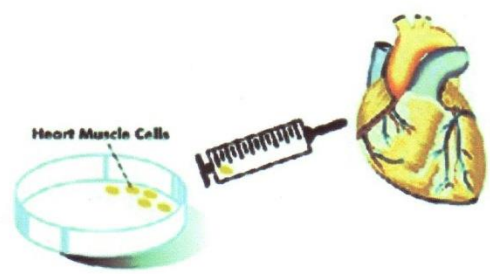
L'uso di cellule da modo
embrionale per produrre
varie tecnologie di cellule



Stem cells



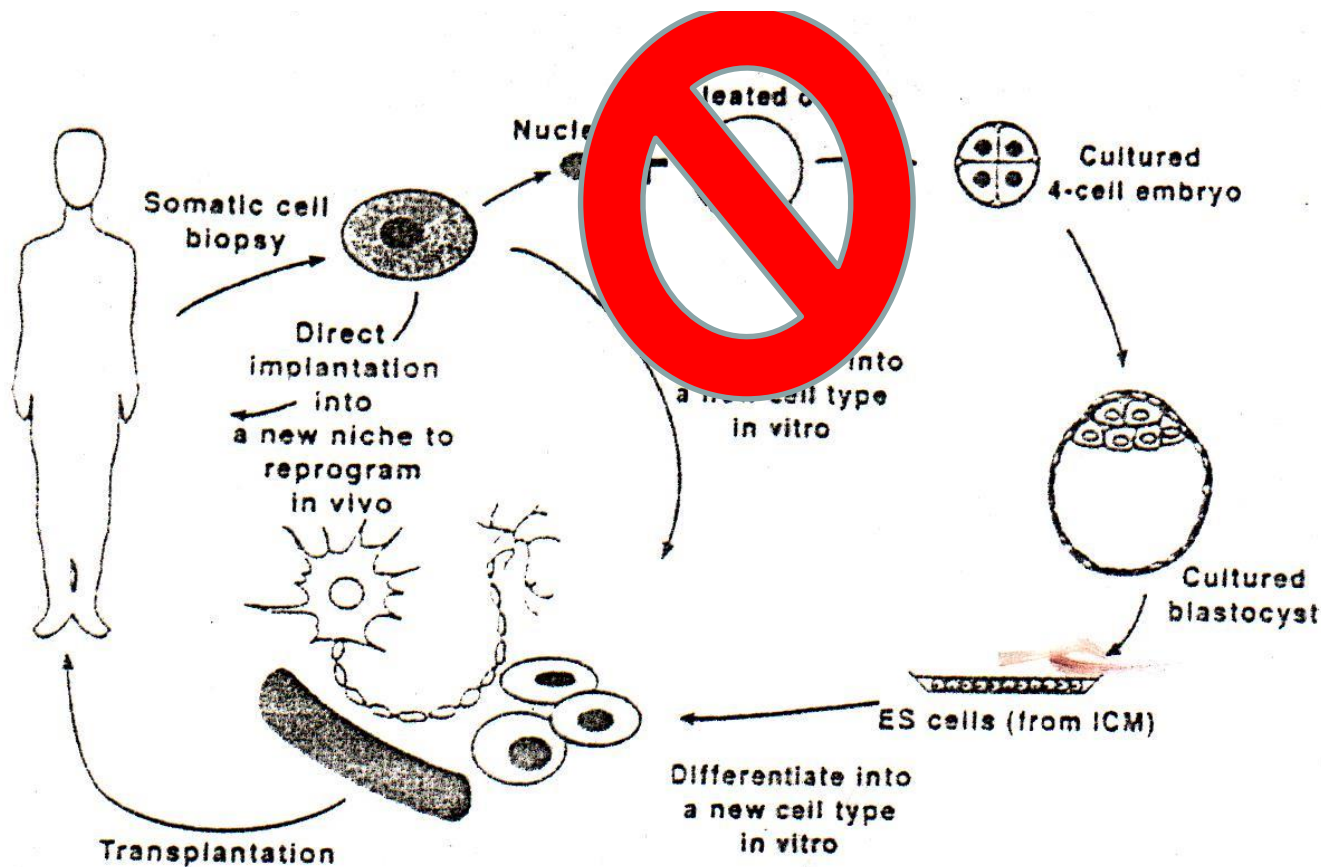
Envisioned Stem Cell Therapy

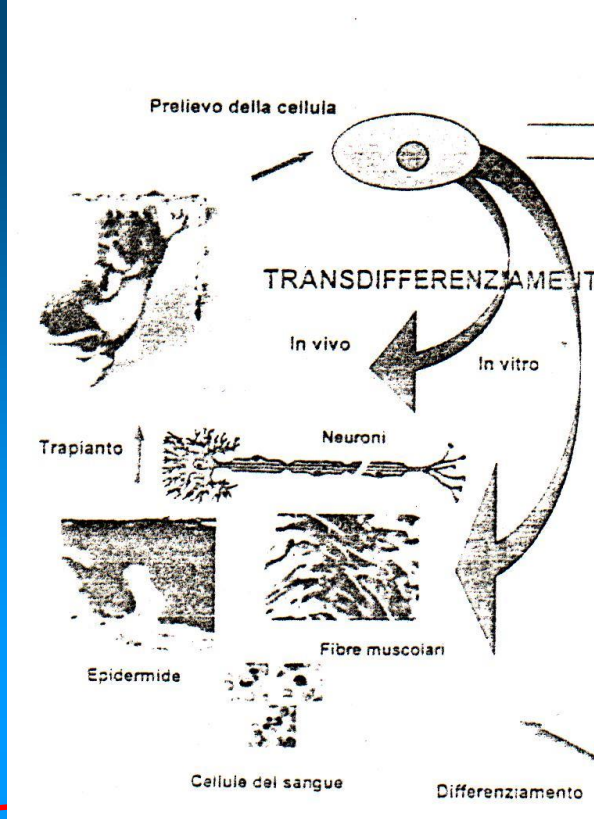


CLONAZIONE TERAPEUTICA

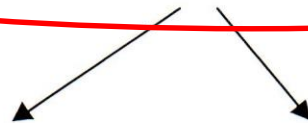
Come si possono ottenere cellule staminali:

- a) prelievo di una cellula somatica del donatore, prelievo del nucleo, trapianto in oocita enucleato, sviluppo fino alla blastocisti, trasferimento in coltura dei blastomeri, differenziamento in vitro



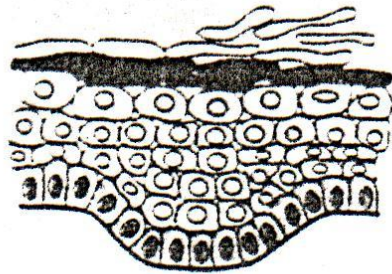


b) prelievo di cellule staminali da individuo adulto, amplificazione dei cloni cellulari in coltura e successivo differenziamento



Induzione del differenziamento in vitro verso la linea "parentale"

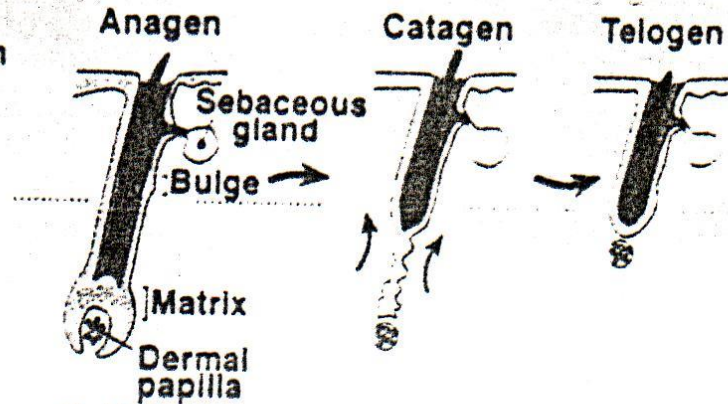
transdifferenziare e indirizzare verso un altro fenotipo diverso da quello "parentale"



Stratum corneum
Granular layer
Spinous layer
Basal layer

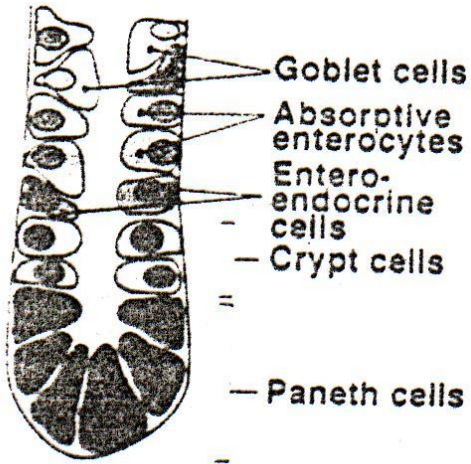
Dermis

A. EPIDERMAL



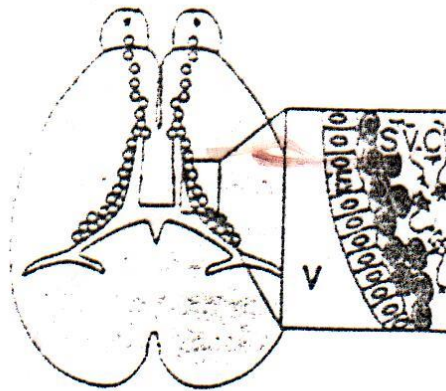
B. FOLLICULAR

C. INTESTINAL

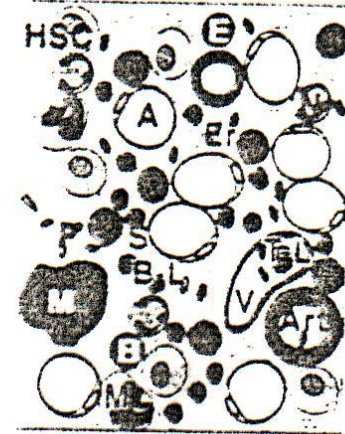


Goblet cells
Absorptive enterocytes
Entero-endocrine cells
Crypt cells
Paneth cells

D. NEURAL OB

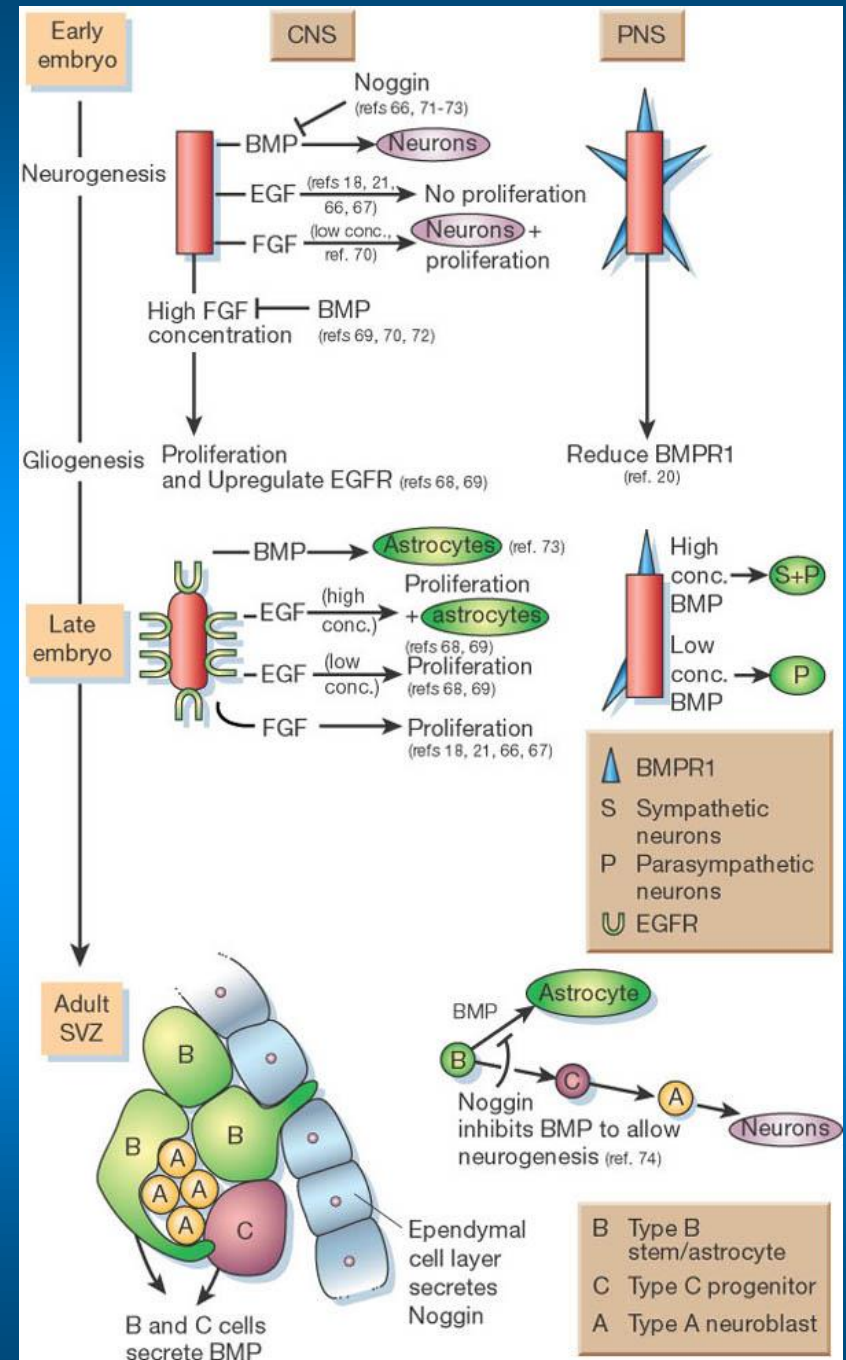
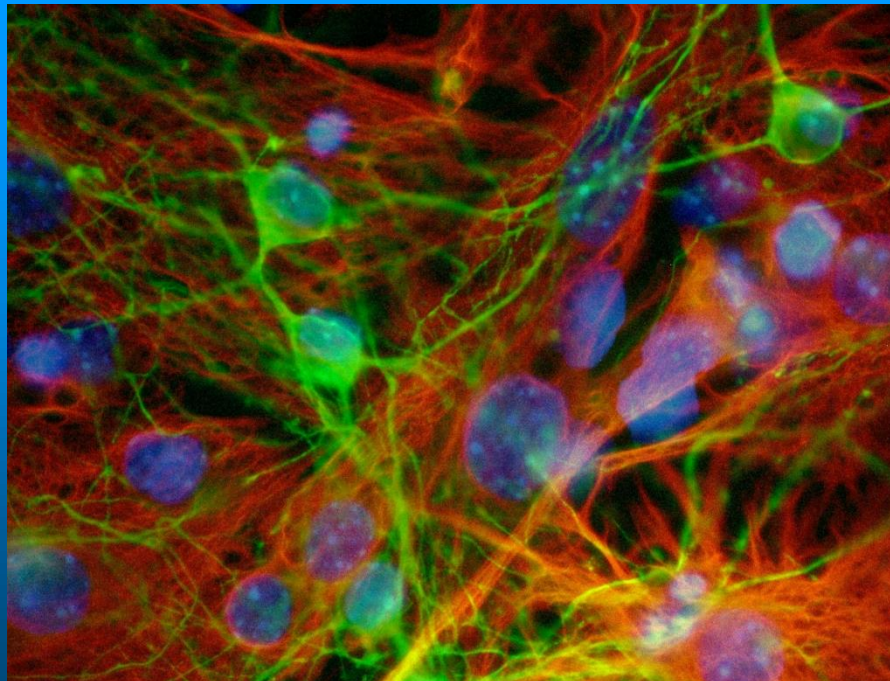
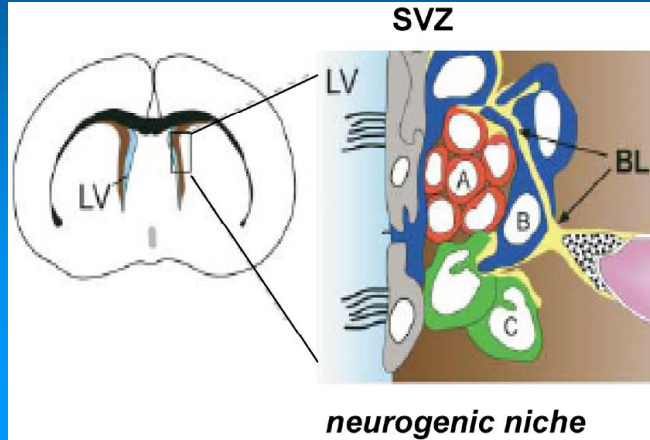


E. HEMATOPOIETIC



Staminali adulte: limitate nello spazio e nel tempo

Neurogenesis adulta



Potenzialità prospettica di un blastomero è superiore al suo destino prospettico

Cellule staminali di un organo sono in grado di generare altri tessuti

CS midollo osseo → elementi figurati del sangue
Cellule muscolari
Epatociti

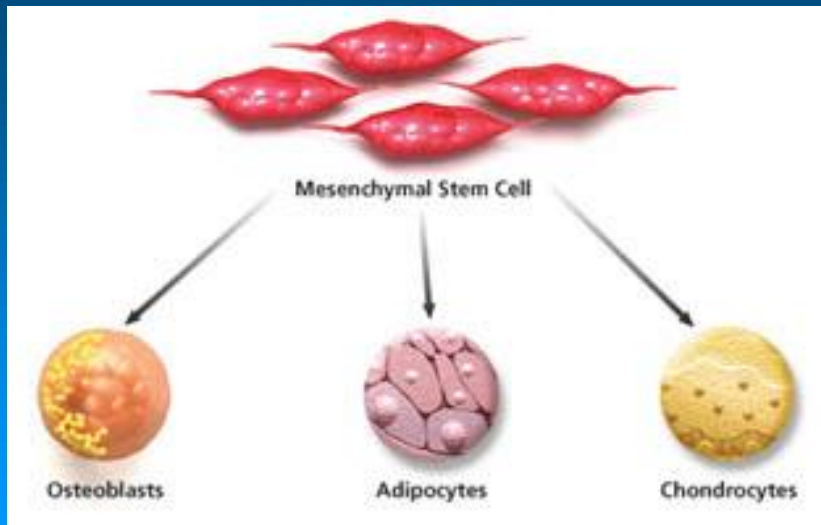
CS del sistema nervoso → possono originare glia e neuroni
Cellule del sangue
Cellule muscolari ◀

1) Tale conversione di percorsi differenziativi richiede approfonditi studi di embriologia

2) Allettanti prospettive terapeutiche: prelievo delle cellule staminali più convenienti e conversione e amplificazione in vitro per ottenere il tessuto di interesse.

Viene così modificato il paradigma classico della multipotenza delle cellule staminali adulte intesa come capacità differenziativa limitata al proprio *lineage*. Questa definizione è stata sostituita dalla nuova teoria della "*developmental plasticity*", ossia la capacità di oltrepassare i confini differenziativi segnati dal tessuto di appartenenza.

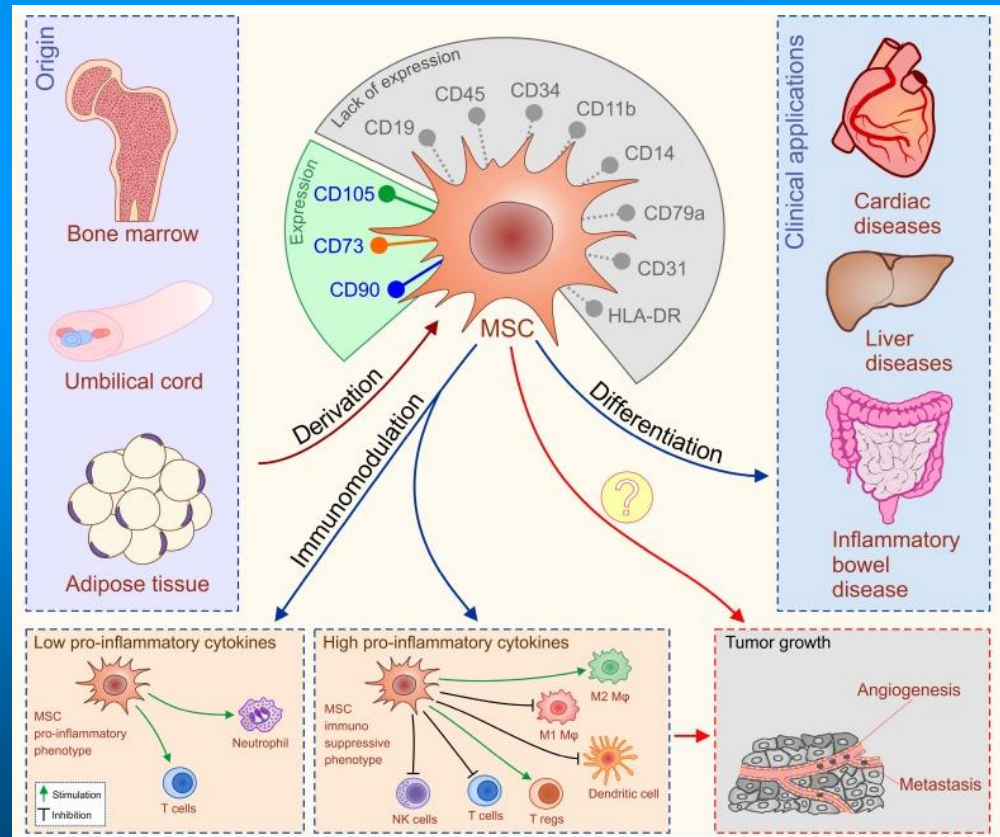
Mesenchymal Stem Cells



1. Da midollo osseo
2. Cordone ombelicale
3. Sangue periferico
4. Placenta
5. Tessuto adiposo

In particolare modo è stato osservato che le MSC sono:

- facilmente isolabili grazie alla loro capacità adesiva;
- facilmente espandibili in vitro in quanto presentano un elevato potenziale replicativo
- in grado di espletare funzioni immunosoppressive e immunomodulatorie;
- in grado di migrare spontaneamente nei tessuti di origine ed anche selettivamente in tessuti danneggiati (*multiorgan homing capacity / tropismo*).



Staminali ematopoietiche: per ricambio di cellule ematiche malate (tumori del sangue) (Peschle- ISS)
Attualmente molto viene fatto a partire da cellule staminali prelevate dal cordone ombelicale.
Più di recente identificata la cellula staminale ematopoietica esprime il recettore per il fattore di crescita endoteliale

Staminali mesenchimali: per il ricambio di osteoblasti, condrociti e di mioblasti (per la rigenerazione e recupero funzionale di osso, cartilagine e muscolo) (P.Bianco- Università "La Sapienza")

Staminali degli Epiteli di rivestimento: per il ricambio di epiteli danneggiati da ustioni o alterati da malattie genetiche
Nuove tecniche anche per i trapianti di cornee ottenute in vitro da cellule staminali del limbo dello stesso paziente
(M.De Luca -IDI Roma)

Staminali cerebrali: eventuale ricambio di neuroni danneggiati da gravi patologie come l'Alzheimer o il Parkinson
(A.Vescovi – DIBIT-HSR-Milano)

ESPERIMENTO

Uovo non fecondato
(tipo 2-nu)

Girino
(tipo 1-nu)

L'irradiazione con
UV distrugge i
cromosomi dell'uovo

Un nucleo di cellula
dell'epitelio intestinale
viene immesso
nell'uovo irradiato

Micropipetta

Uovo
ricevente
irradiato

Nucleo
intestinale

RISULTATI

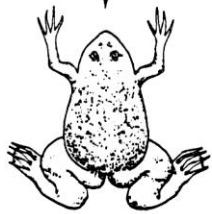
(1)



Blastula



Girino



Rana adulta
(tipo 1-nu)

(2)



Blastula



Girino
(muore)

(3)

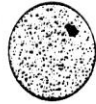


Blastula



Embrione
anormale

(4)



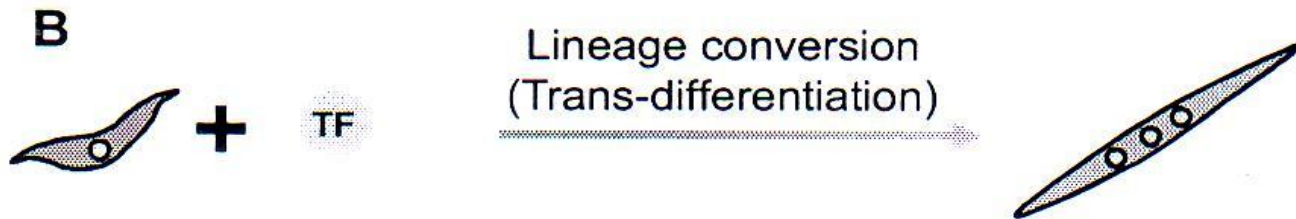
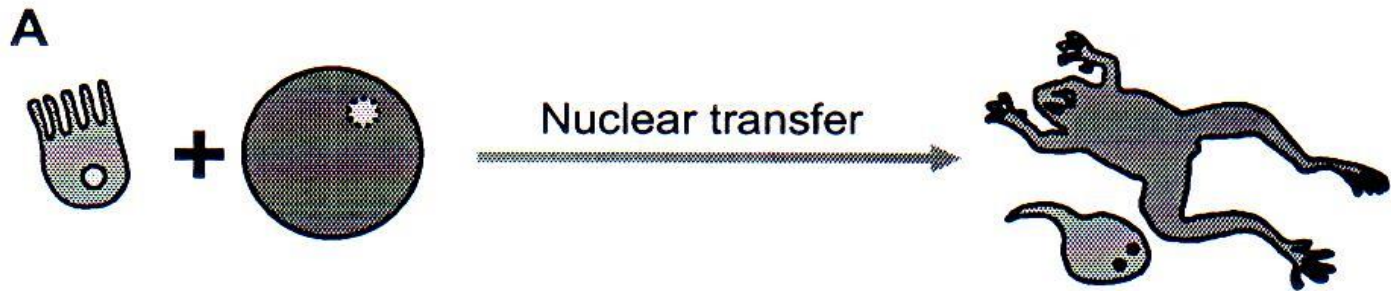
Nessuna
divisione

The Developmental Capacity of Nuclei
taken from
Intestinal Epithelium Cells of Feeding
Tadpoles

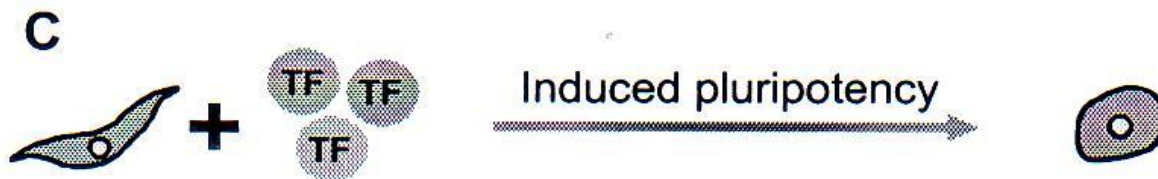
J. B. GURDON

*From the Embryology Laboratory,
Department of Zoology, Oxford*

Come favorire la formazione di specifici tipi cellulari ????

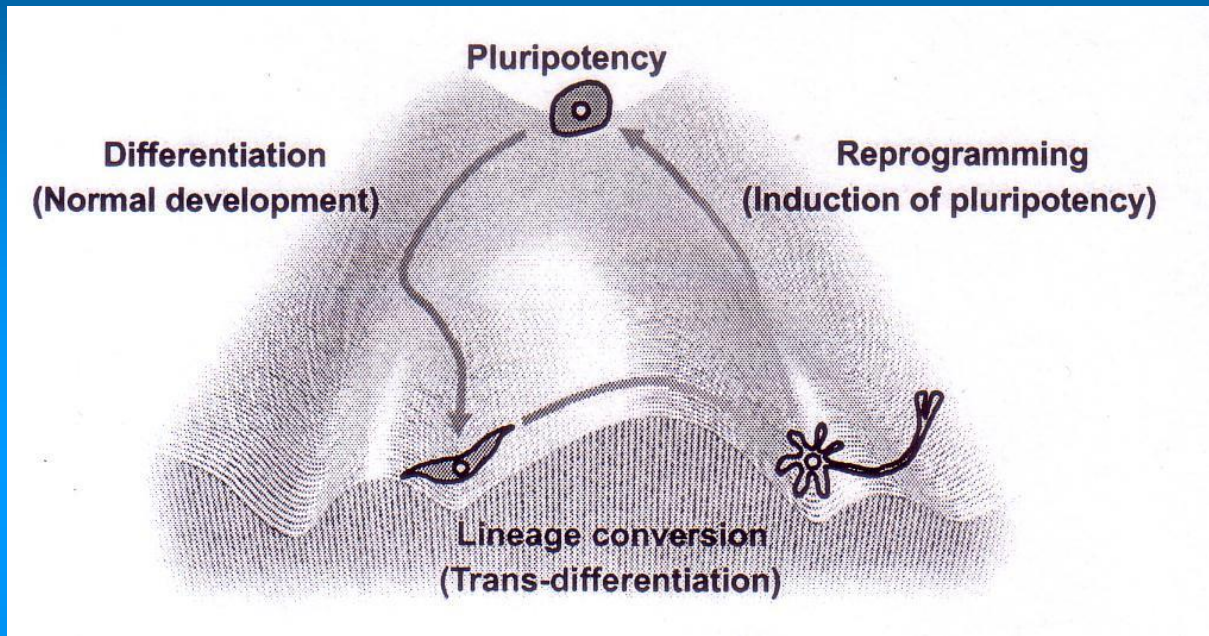


E' possibile far transdifferenziare le cellule terminalmente differenziate?



iPS

(Yamanaka, 2006)



Fibroblasti di topo trasfettati con fattori trascrizionali (Sox2, Oct4, Klf4; c-Myc)

- 1. Le cellule riprogrammano i loro nuclei e tornano in uno stadio indifferenziato**
- 2. Se indotte a differenziare possono originare cellule diverse da quelle di origine**

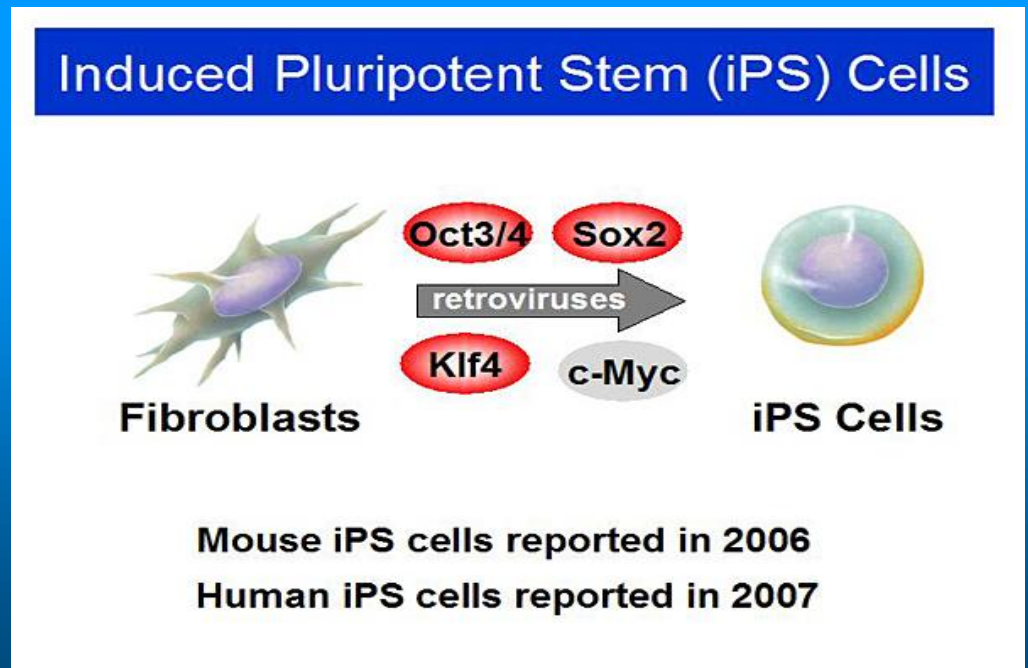
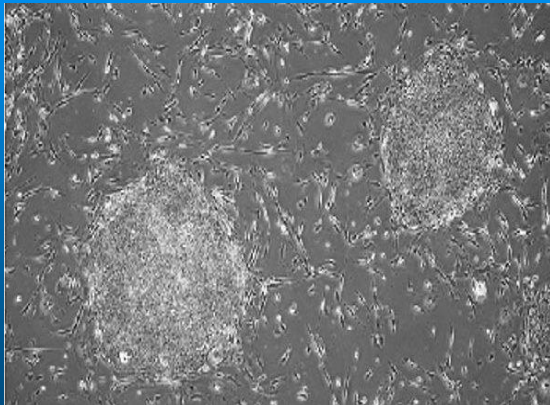
Vantaggi: si possono riprogrammare cellule mature

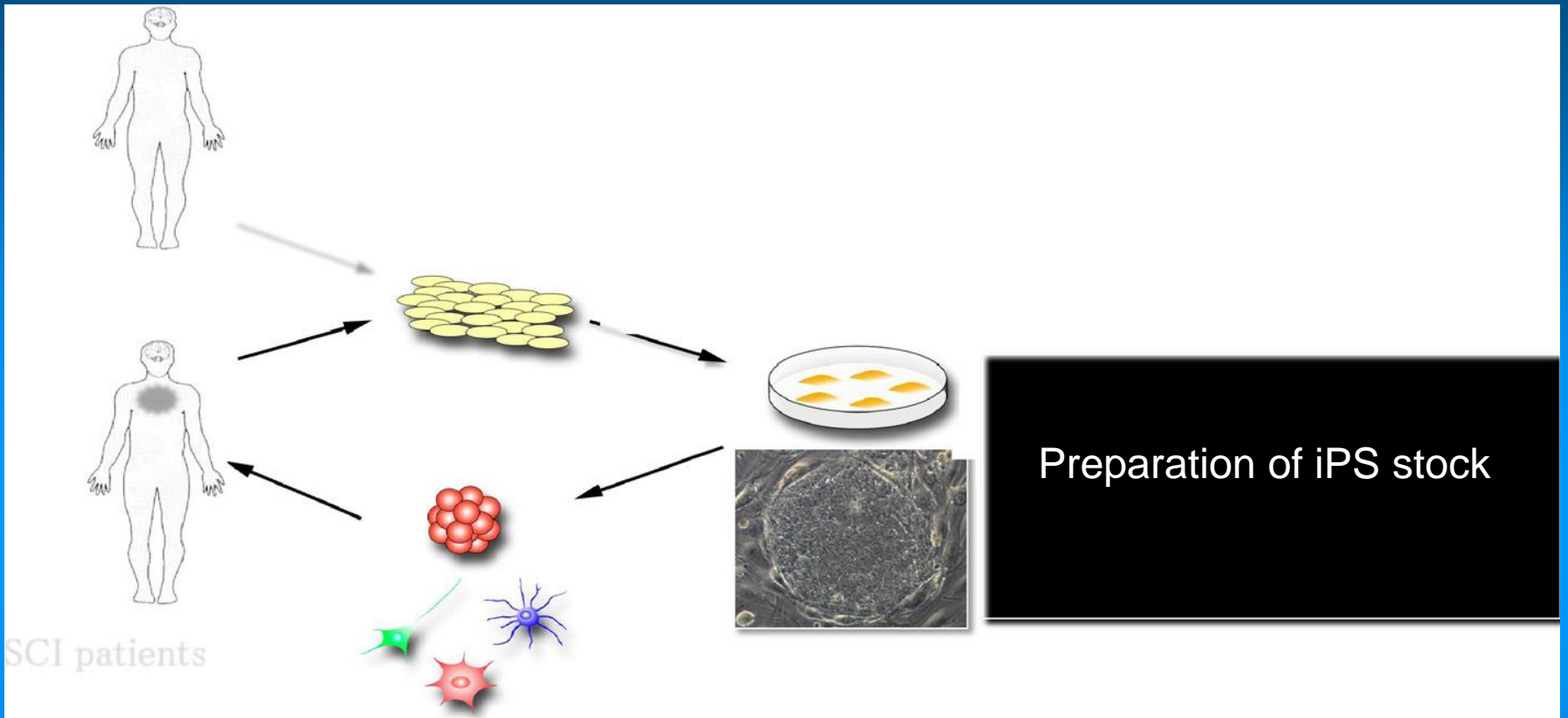
Svantaggi: non conosciamo il potenziale carcinogenico di queste cellule riprogrammate

Cellule staminali iPS

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) sono cellule con caratteristiche simili a quelle delle cellule staminali embrionali ma vengono ottenute artificialmente in laboratorio da cellule adulte già differenziate.

Yamanaka et al. nel 2006 → Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc = 4 geni codificanti per fattori di trascrizione che normalmente agiscono nelle cellule staminali embrionali inseriti nelle cellule adulte determinano l'auto-rinnovamento e la pluripotenza.





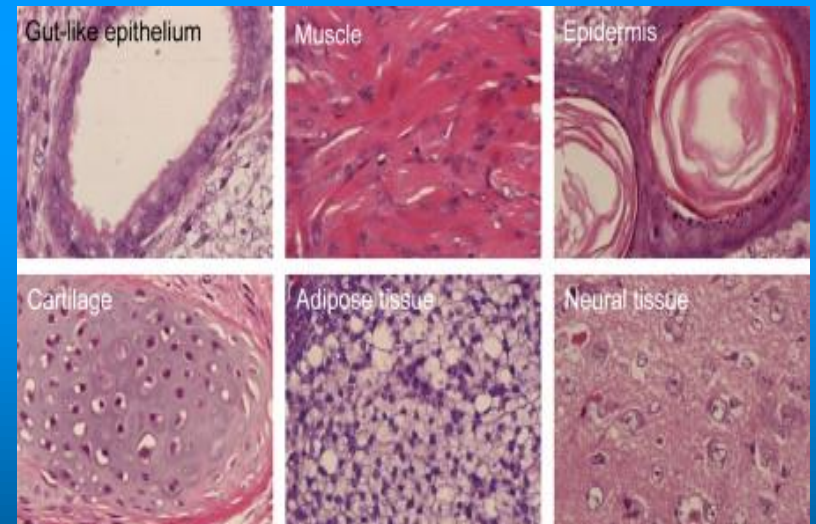
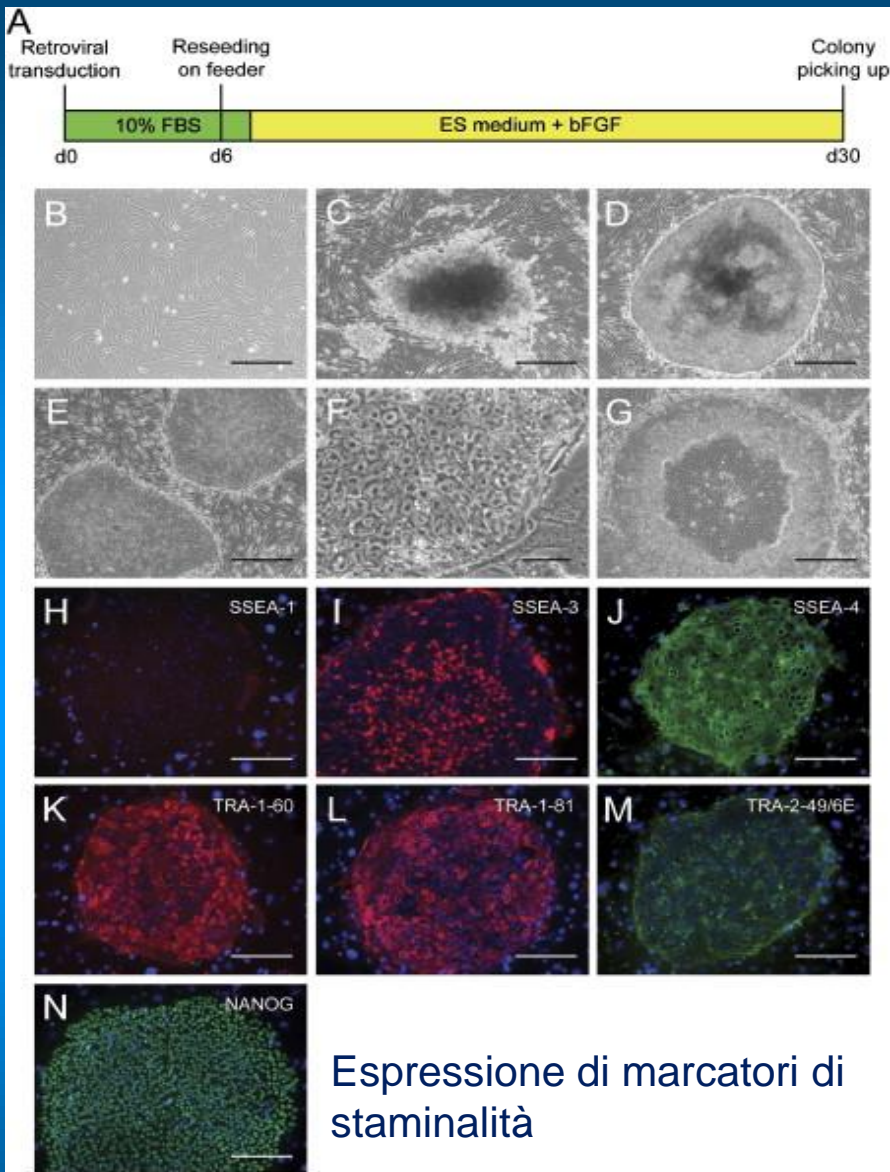
**Preparation of clinical grade iPS-cell-derived NS/PCs stocks
(Okano Group in Keio University)**

Neural differentiation and expansion of iPS-derived NS/PCs at the GMP level.

Quality control of clinical grade iPS-cell-derived NS/PCs.

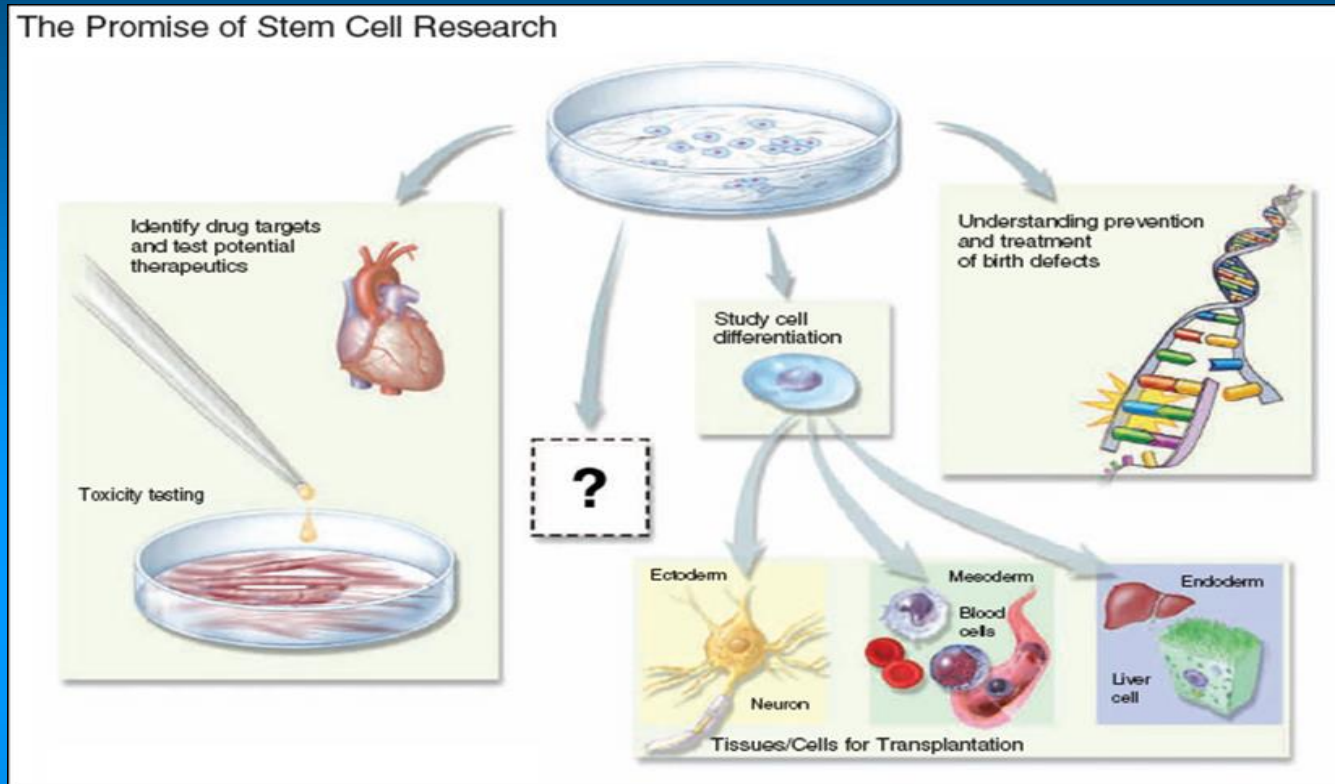
Freeze and Stocks of clinical grade iPS-cell-derived NS/PCs.

Caratteristiche delle iP



Formazione di Teratomi

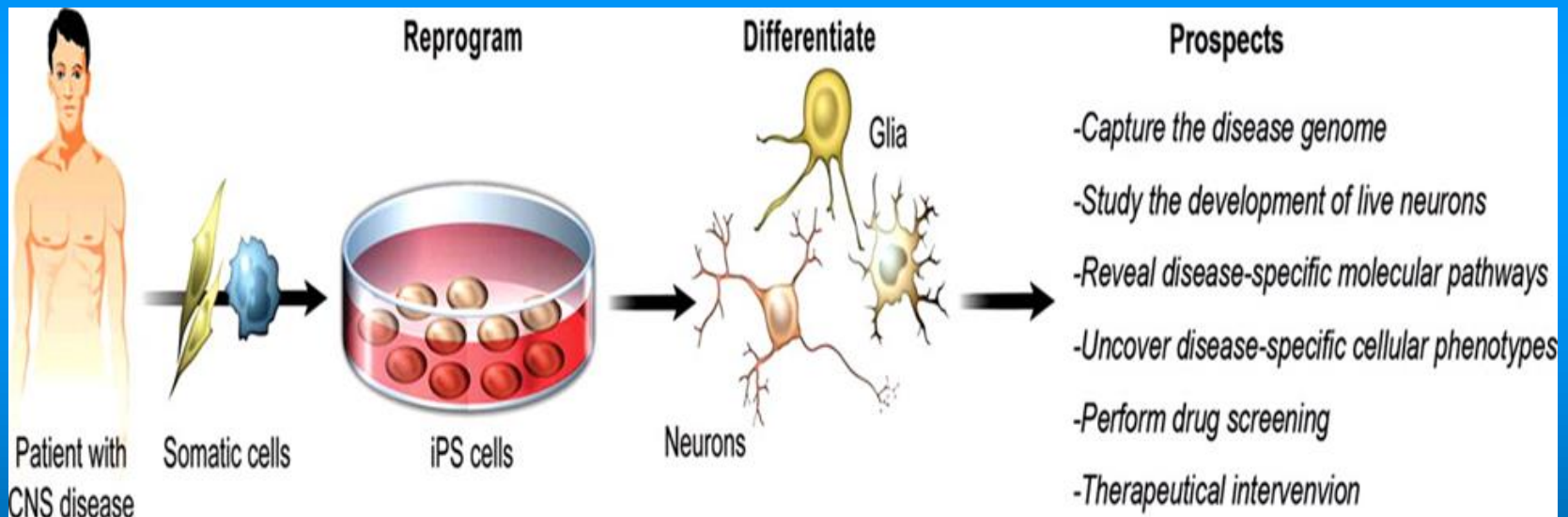
iPS e Medicina Rigenerativa



- **Generazione di cellule utili per il trapianto (trapianti autologhi)**
- **Modello cellulare *in vitro* utile per la comprensione, prevenzione e trattamento di patologie dovute a difetti genetici**
- **Modelli cellulari per screening farmacologici**

Applicazione delle iPS in patologie neurologiche

- ❖ Per molte malattie neurodegenerative attualmente non ci sono cure efficaci e risolutive.
- ❖ Studiare i meccanismi molecolari di queste patologie potrebbe trarre un importante vantaggio dall'uso di un modello neuronale in vitro



Spinal cord injury
Parkinson disease

ALS
Alzheimer
Parkinson

CELL THERAPY

Disease Modeling
Drug Development

iPS

```
graph TD; iPS((iPS)) --> CT[CELL THERAPY]; iPS --> DM[\"Disease Modeling  
Drug Development\"];
```

The diagram illustrates the central role of induced pluripotent stem (iPS) cells in regenerative medicine and drug development. A central light blue oval labeled 'iPS' has two arrows pointing upwards to two dark blue rounded rectangular boxes. The left box is labeled 'CELL THERAPY' and is associated with 'Spinal cord injury' and 'Parkinson disease'. The right box is labeled 'Disease Modeling' and 'Drug Development' and is associated with 'ALS', 'Alzheimer', and 'Parkinson'.

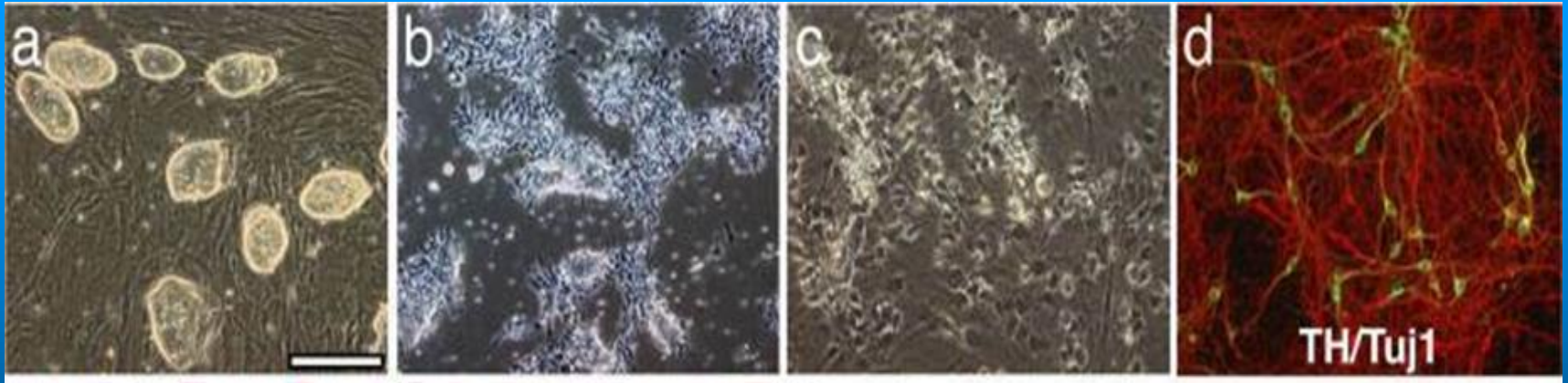
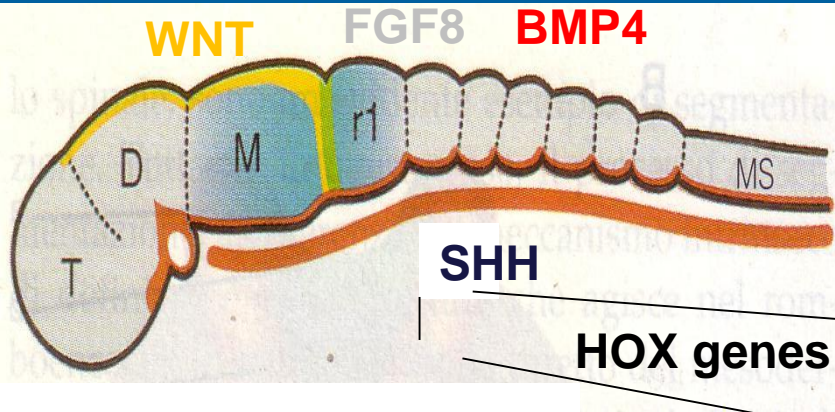
Neuralizzazione di cellule iPS

Fattori implicati nella neurogenesi embrionale



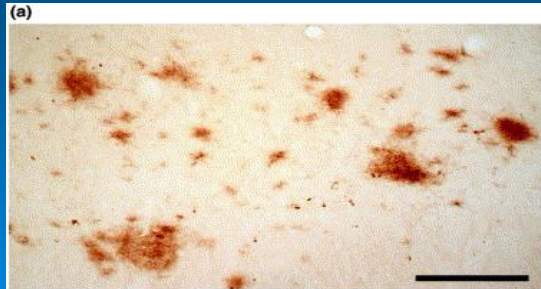
Differenziamento in neuroni di cellule iPS.

- **EGF (Fattore di crescita dell'epidermide)**
- **FGF-2 (Fattore di crescita dei fibroblasti) ed FGF-8**
- **Nogging**
- **Sonic hedgehog**

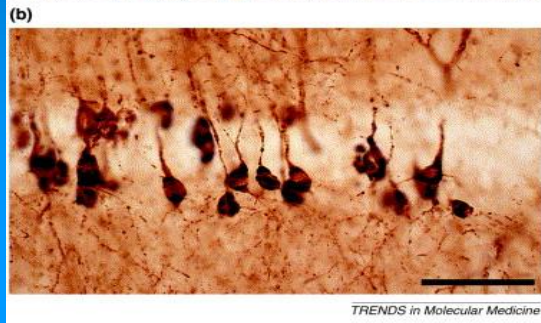


(Werning et al.; 2008).

Patologia di Alzheimer

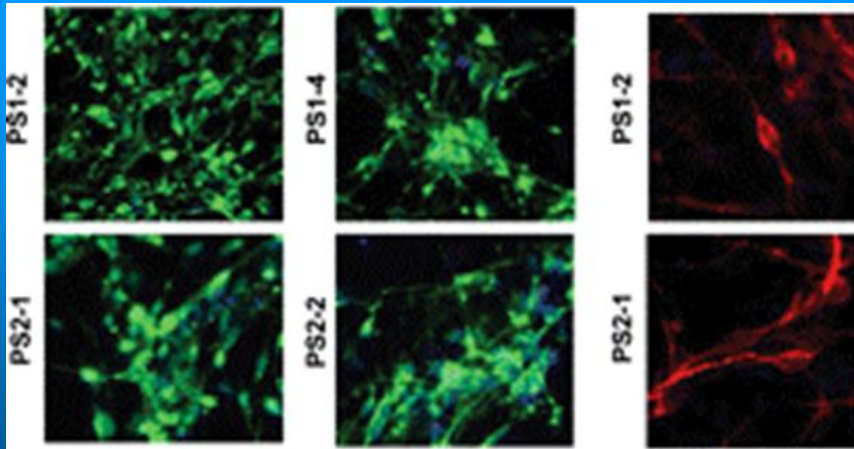
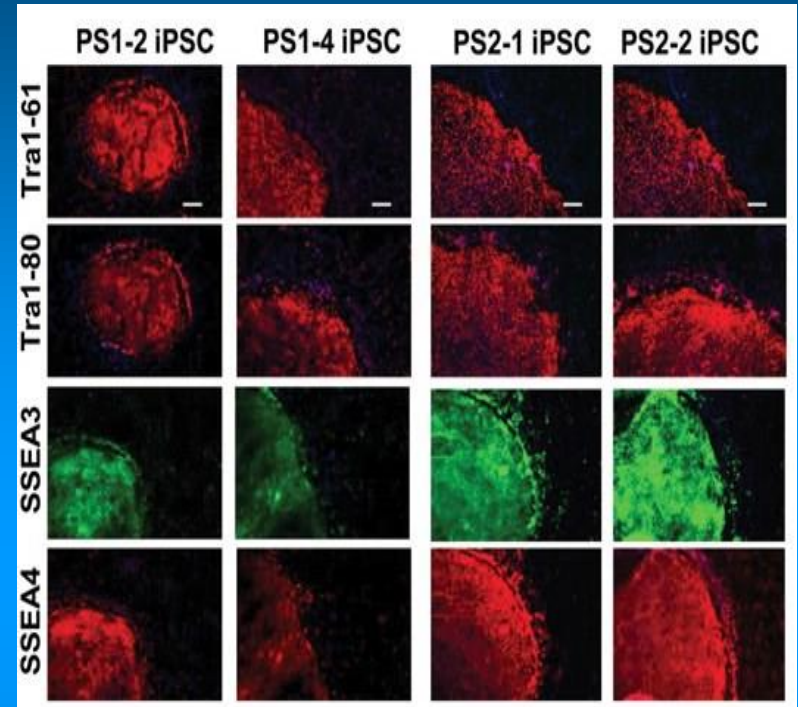


Accumulo di beta-amiloide



Depositi neurofibrillari

TRENDS in Molecular Medicine



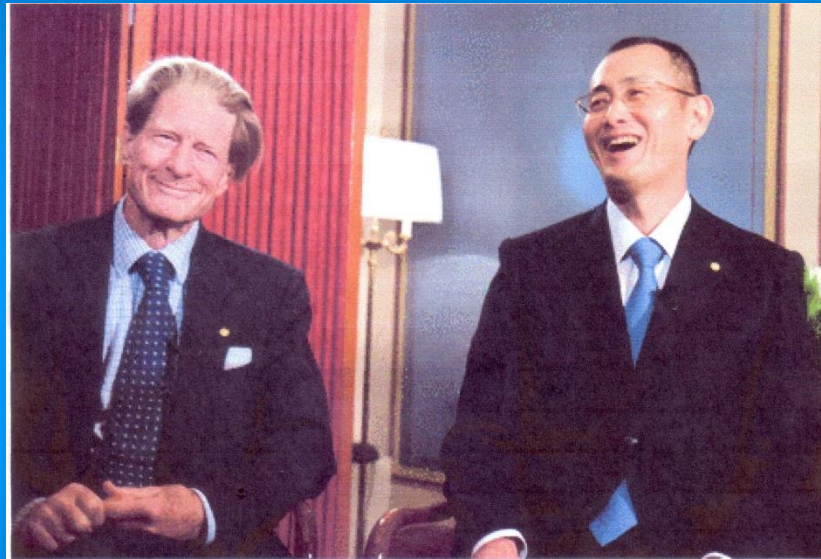
Fibroblasti di pazienti FAD con mutazioni PS1 e PS2 → iPS → neuroni:

- Esprimono marcatori neuronali (beta-III tub, MAP2)
- secrezione di A β 42 aumentata

Premio Nobel 2012

John Gurdon

Shinya Yamanaka



Riprogrammare cellule mature
(riprogrammando i nuclei) in cellule pluripotenti