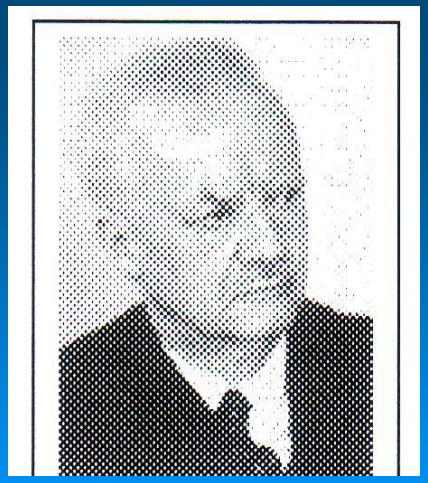
La biologia dello sviluppo nella ricerca di base e applicata

La clonazione e le cellule staminali

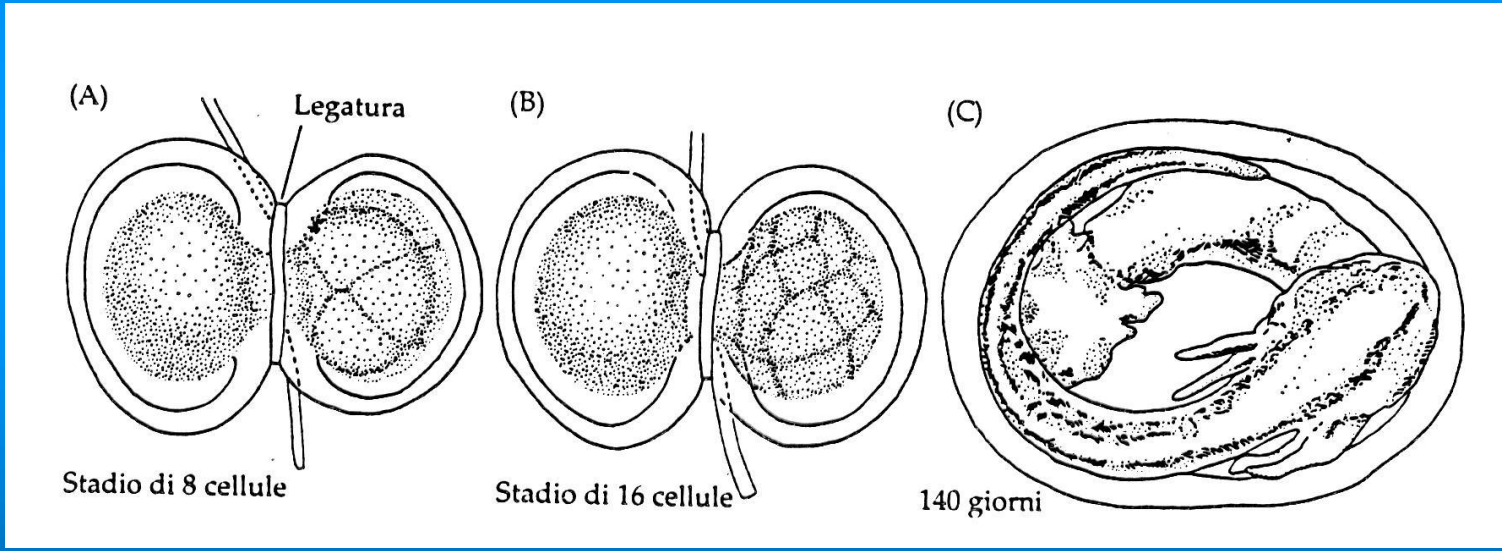
Il problema centrale della Biologia dello Sviluppo è quello di comprendere

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

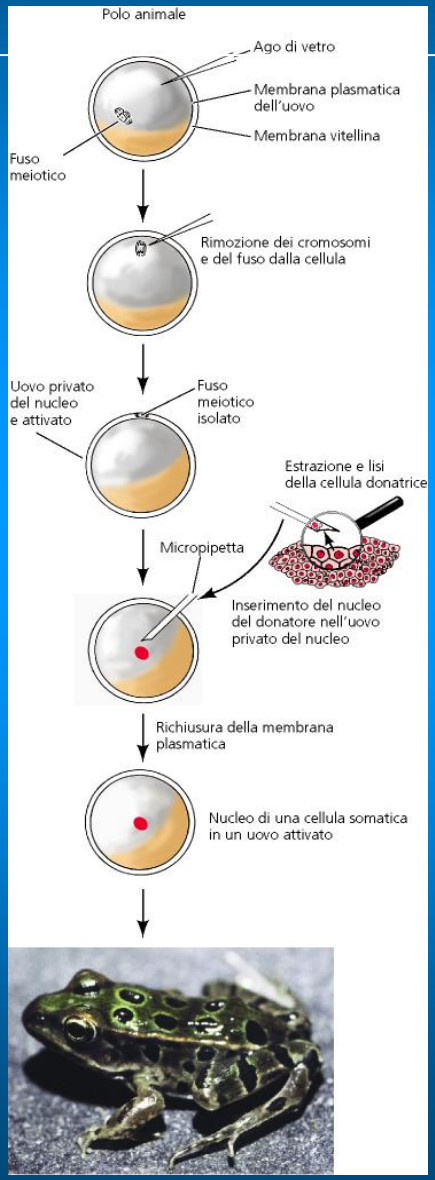


*TRANSPLANTATION OF LIVING NUCLEI FROM BLASTULA CELLS INTO ENUCLEATED FROGS' EGGS**

ROBERT BRIGGS AND THOMAS J. KING

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

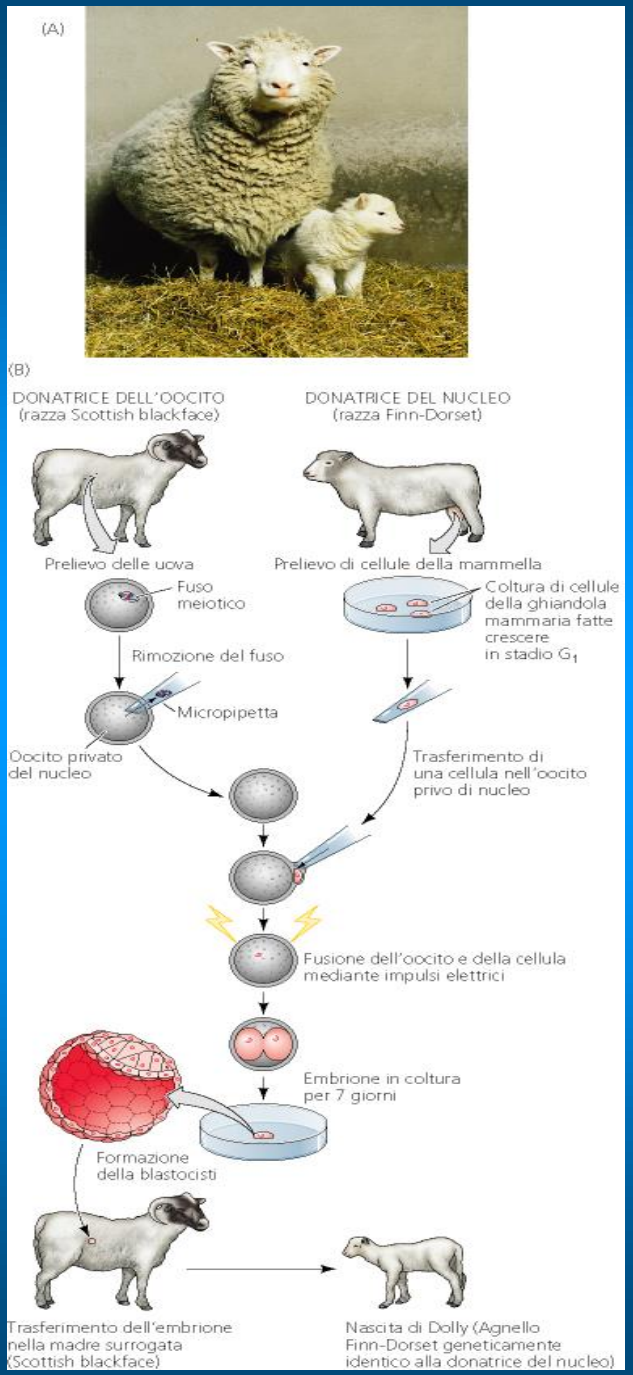
Communicated by C. W. Metz, March 15, 1952





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

- Il trasferimento dei nuclei in cellule uovo anucleate e lo sviluppo potenziale di un nuovo individuo è a tutti gli effetti un processo di clonazione:
- Il nuovo individuo eredita i geni dell'individuo donatore
- In organismi più semplici come gli anfibi è stato possibile dimostrare che la clonazione è possibile anche se con scarsa efficienza



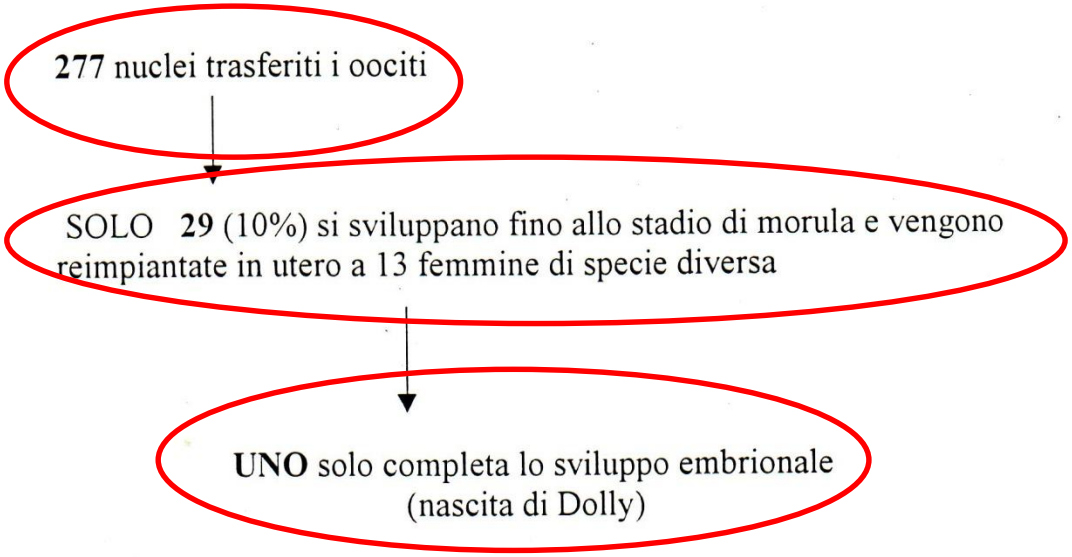
La sfida è stata dimostrare la clonazione in organismi superiori come i mammiferi

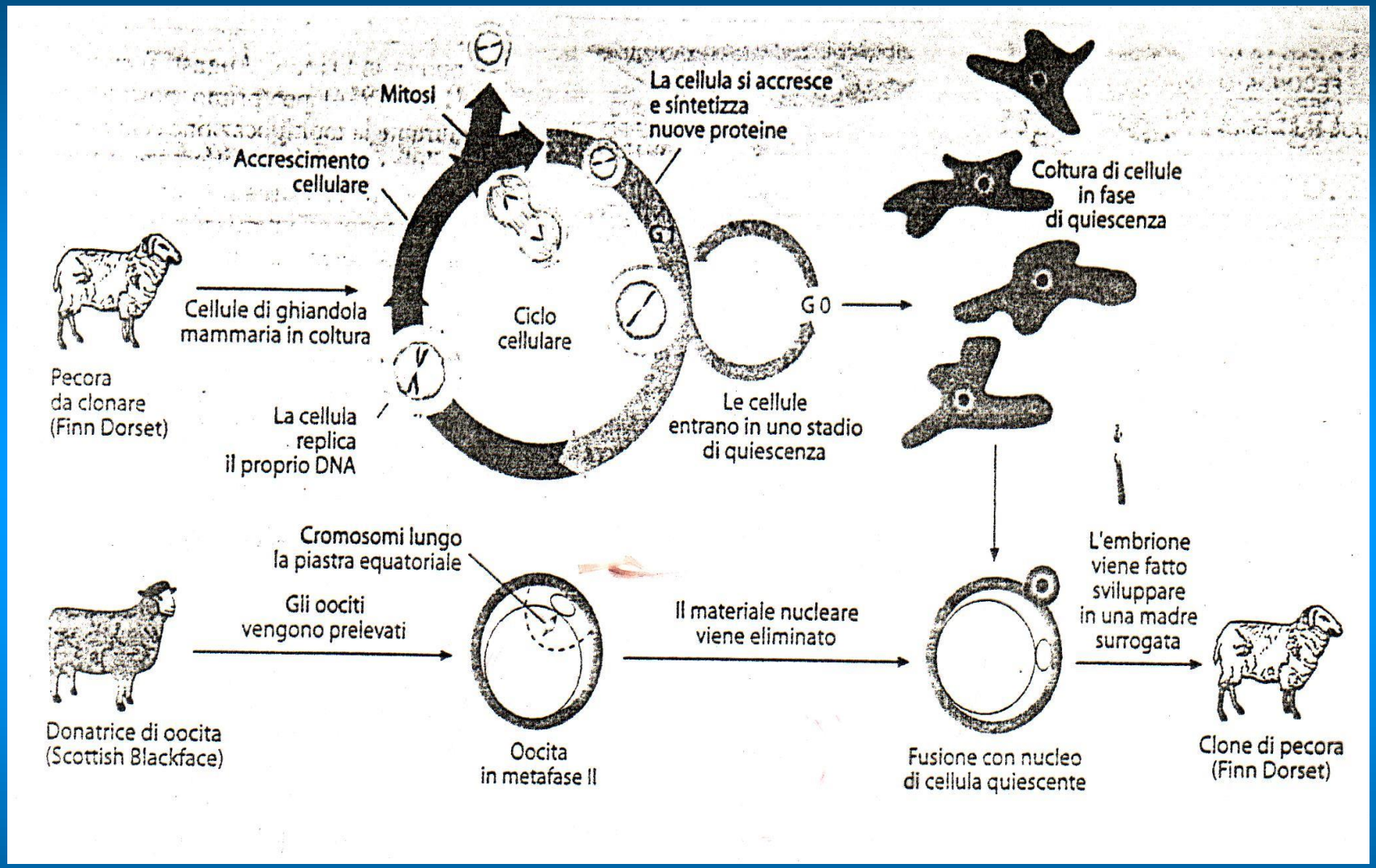
Il caso di Dolly

Campbell e Wilmut (1996): clonazione della pecora Dolly

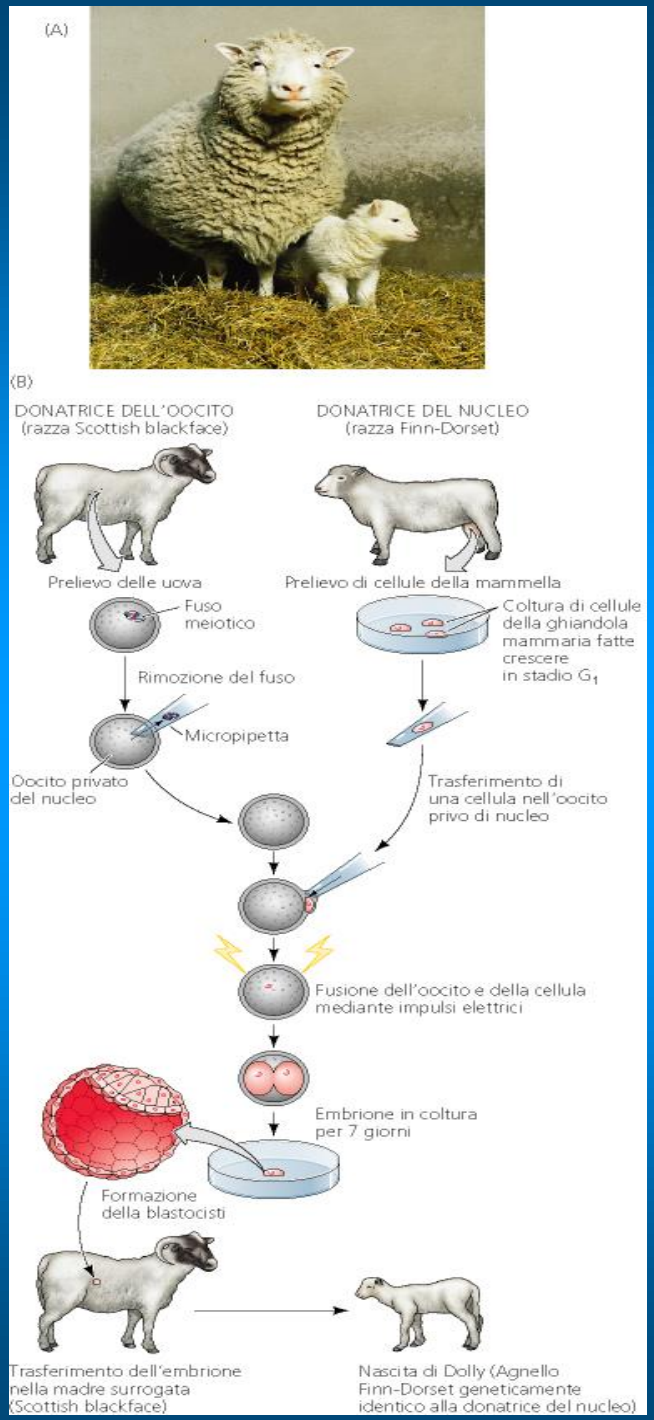
1) Prelievo di cellule embrionali staminali (blastocisti) ;
2) Crescita in coltura
3) Trapianto di nuclei in oociti enucleati e reimpianto in utero

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





Campbell e Wilmut 1996


(A)
(B)
DONATRICE DELL'OOCITO
(razza Scottish blackface)
DONATRICE DEL NUCLEO
(razza Finn-Dorset)
Prelievo delle ucva
Prelievo di cellule della mammella
Fuso
meiotico
Coltura di cellule
della ghiandola
mammaria fatte
crescere
in stadio G_1
Rimozione del fuso
Micropipetta
Oocito privato
del nucleo
Trasferimento di
una cellula nell'oocito
privo di nucleo
Fusione dell'oocito e della cellula
mediante impulsi elettrici
Embrione in coltura
per 7 giorni
Formazione
della blastocisti
Trasferimento dell'embrione
nella madre surrogata
(Scottish blackface)
Nascita di Dolly (Agnello
Finn-Dorset geneticamente
identico alla donatrice del nucleo)

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.

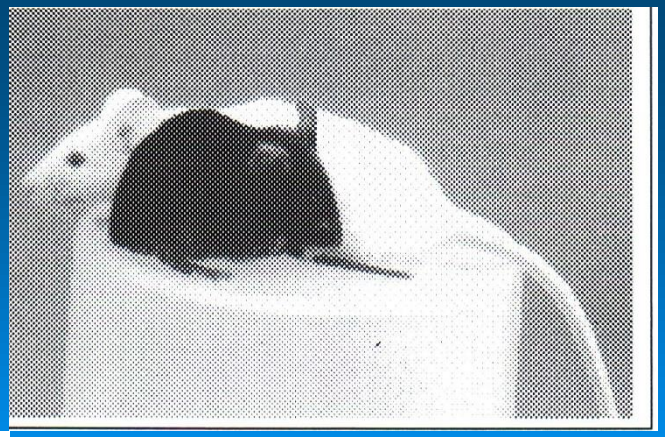
Yanagimachi et al (Nature 1998) pubblica la clonazione di topolini da trapianto di nuclei somatici

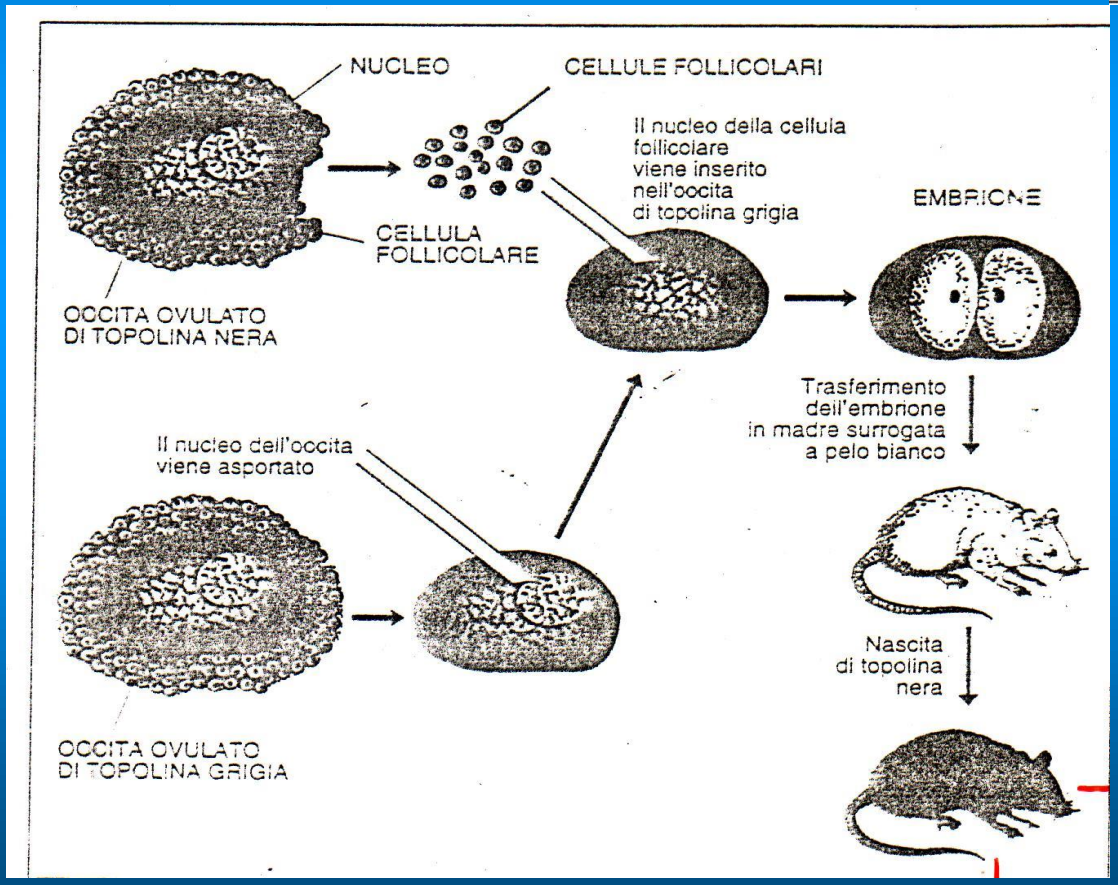
1) cellule del cumulo ooforo
2) cellule del Sertoli
3) cellule nervose

→

Sono in fase G0
Non si moltiplicano più
Sono differenziate

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

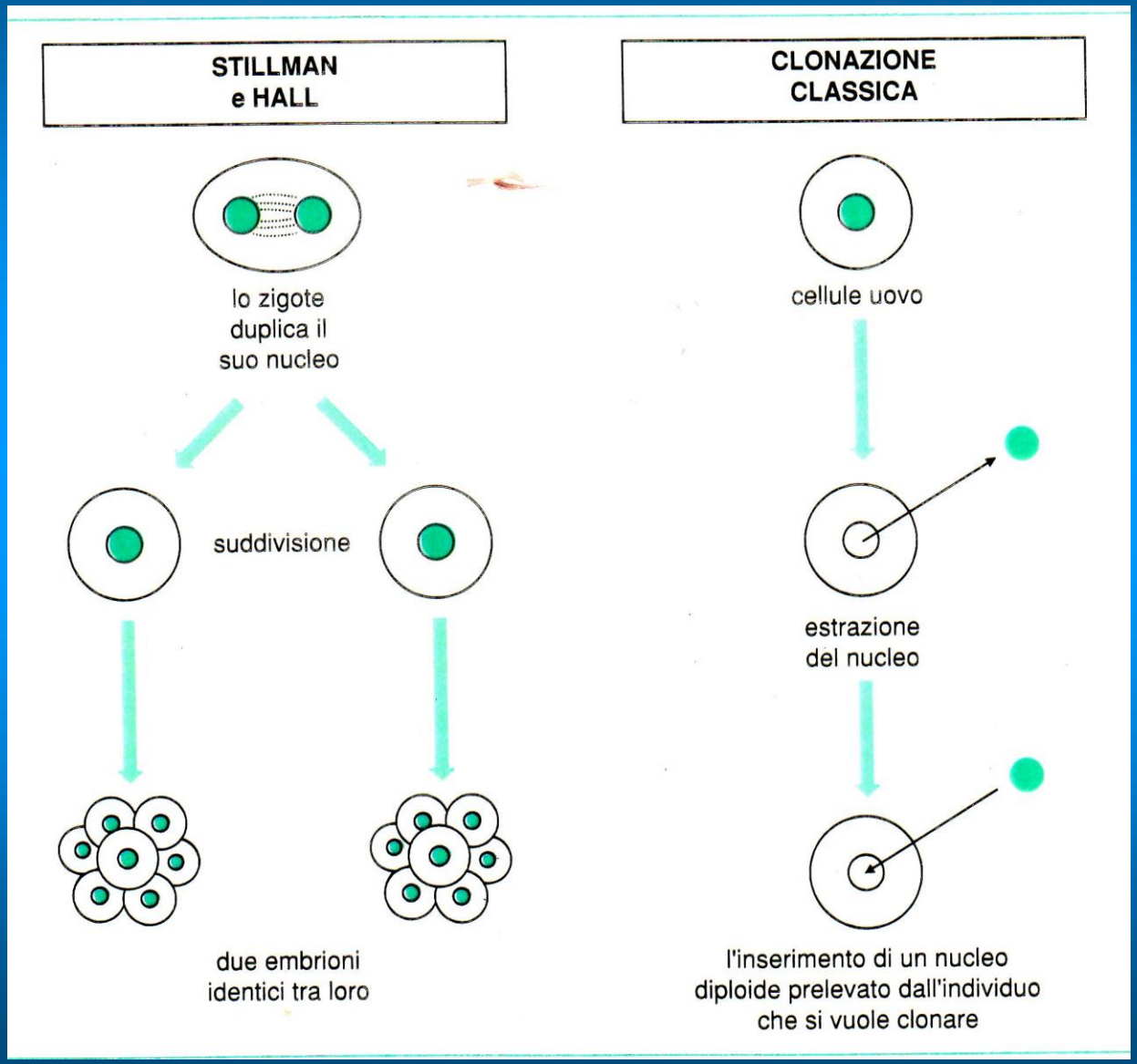
Tali conoscenze aprono prospettive nel campo delle applicazioni zootecniche

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

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 gradi di differenziarsi in un unico tipo cellulare esse sono dette ***UNIPOTENTI***

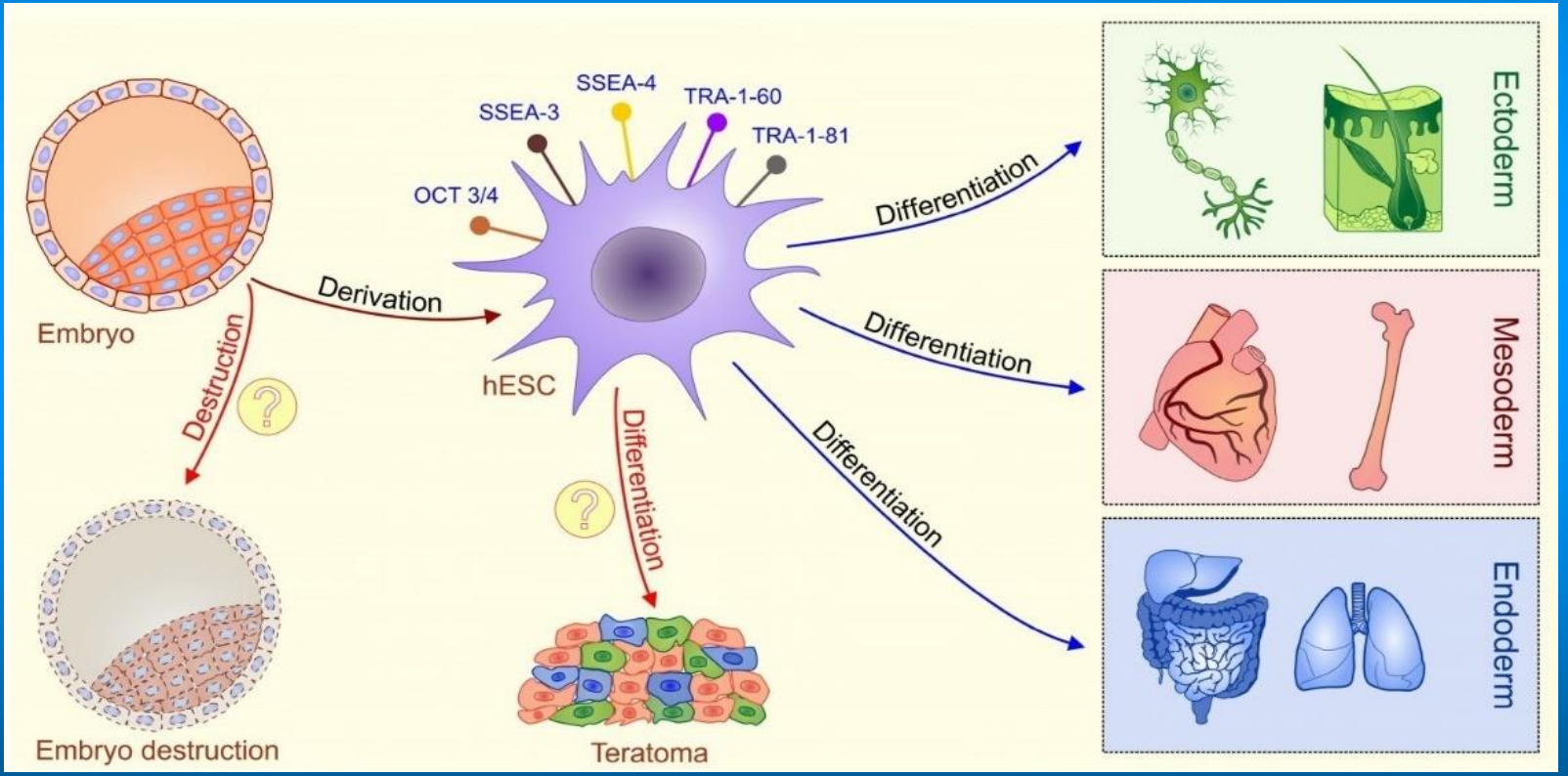
2) Le cellule dei tre foglietti embrionali poiché in grado di generare un numero più ampio di derivati tissutali sono dette ***MULTIPOTENTI***

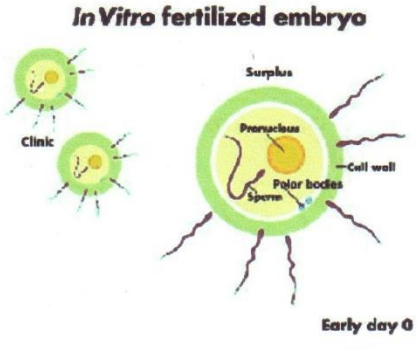
3) Le cellule del nodo embrionale, poiché in grado di generare tutti i tessuti dell'embrione sono dette ***PLURIPOTENTI***

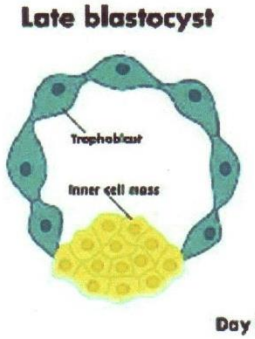
4) Lo zigote è invece una cellula ***TOTIPOTENTE***

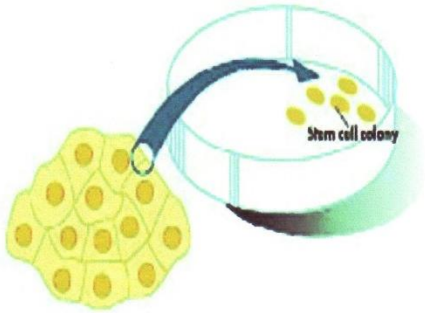
Cellule staminali embrionali

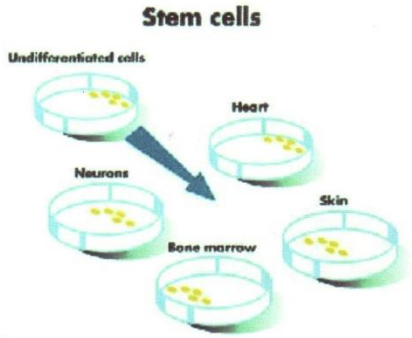
Le cellule della massa cellulare interna sono staminali pluripotenti

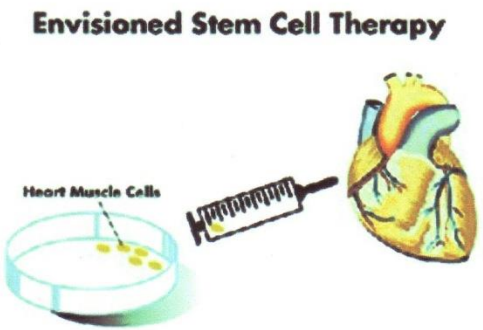




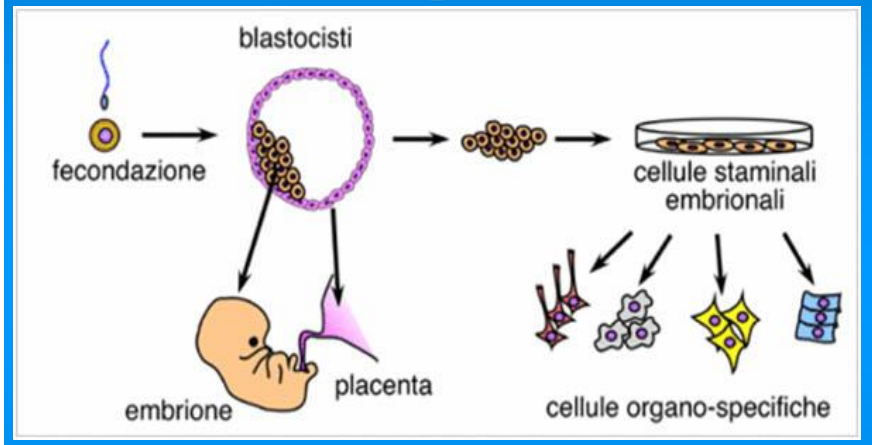




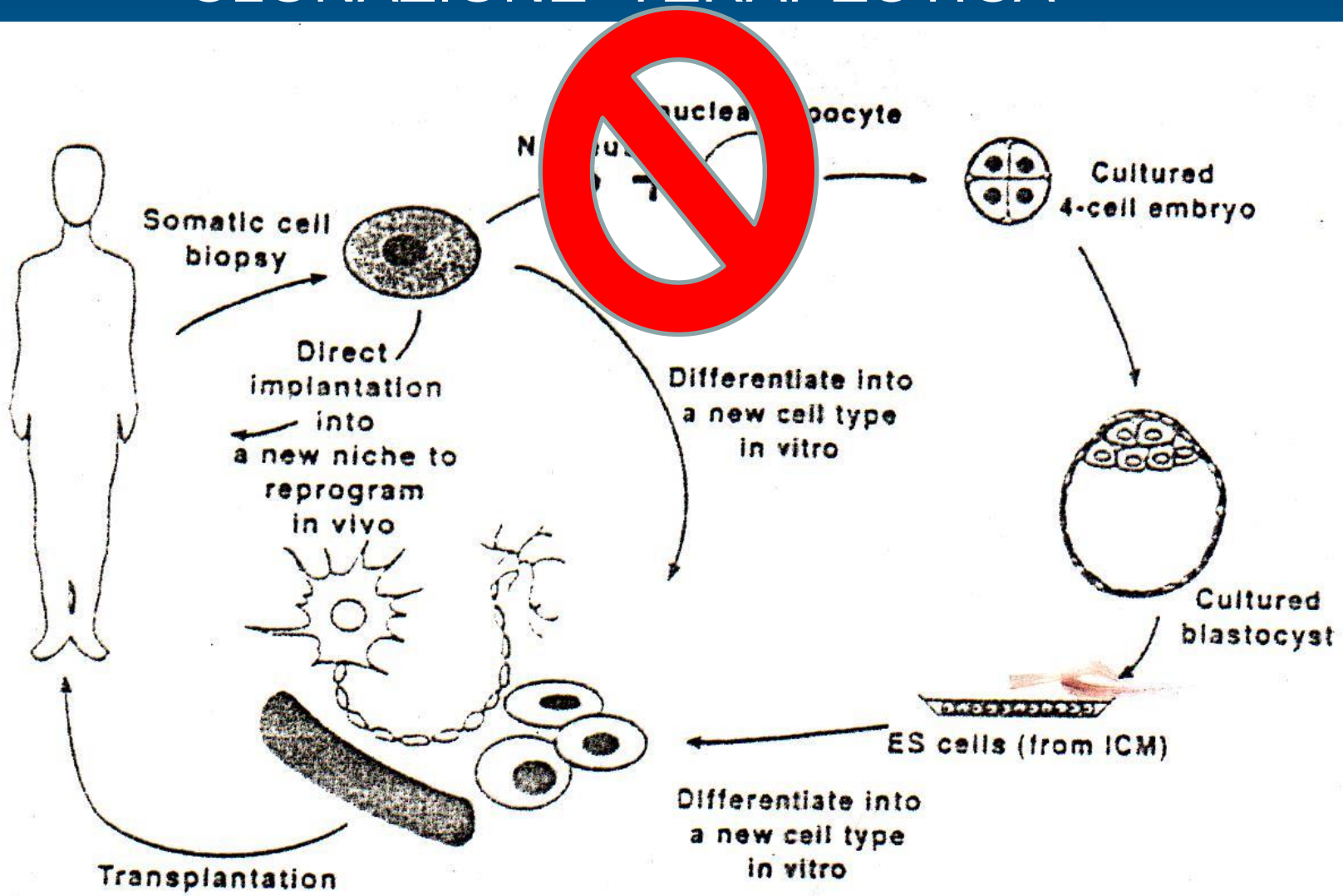


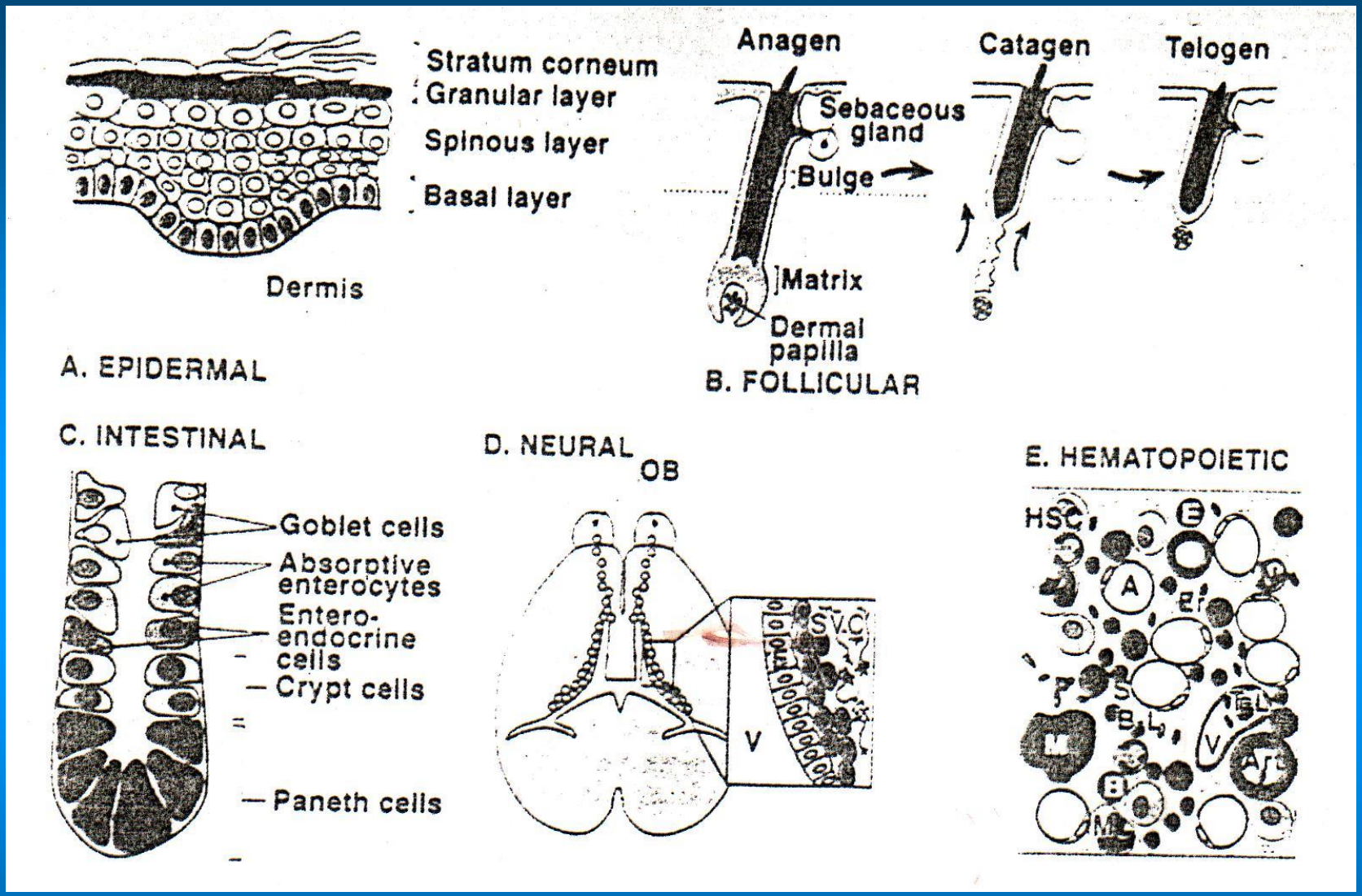


L'uso [illegible] modo embri[illegible] produrre varie [illegible] cellule



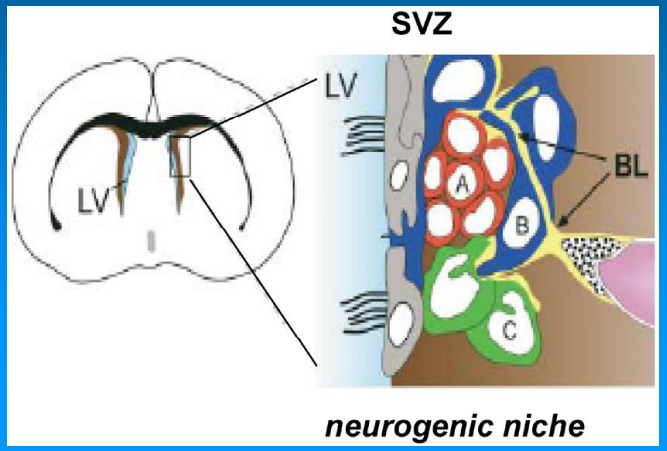
CLONAZIONE TERAPEUTICA

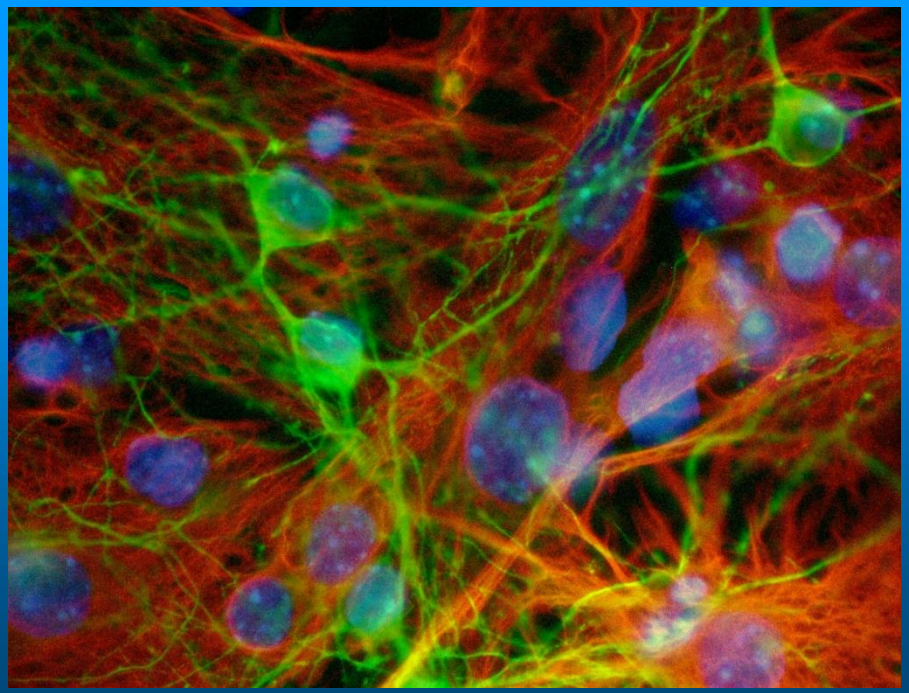


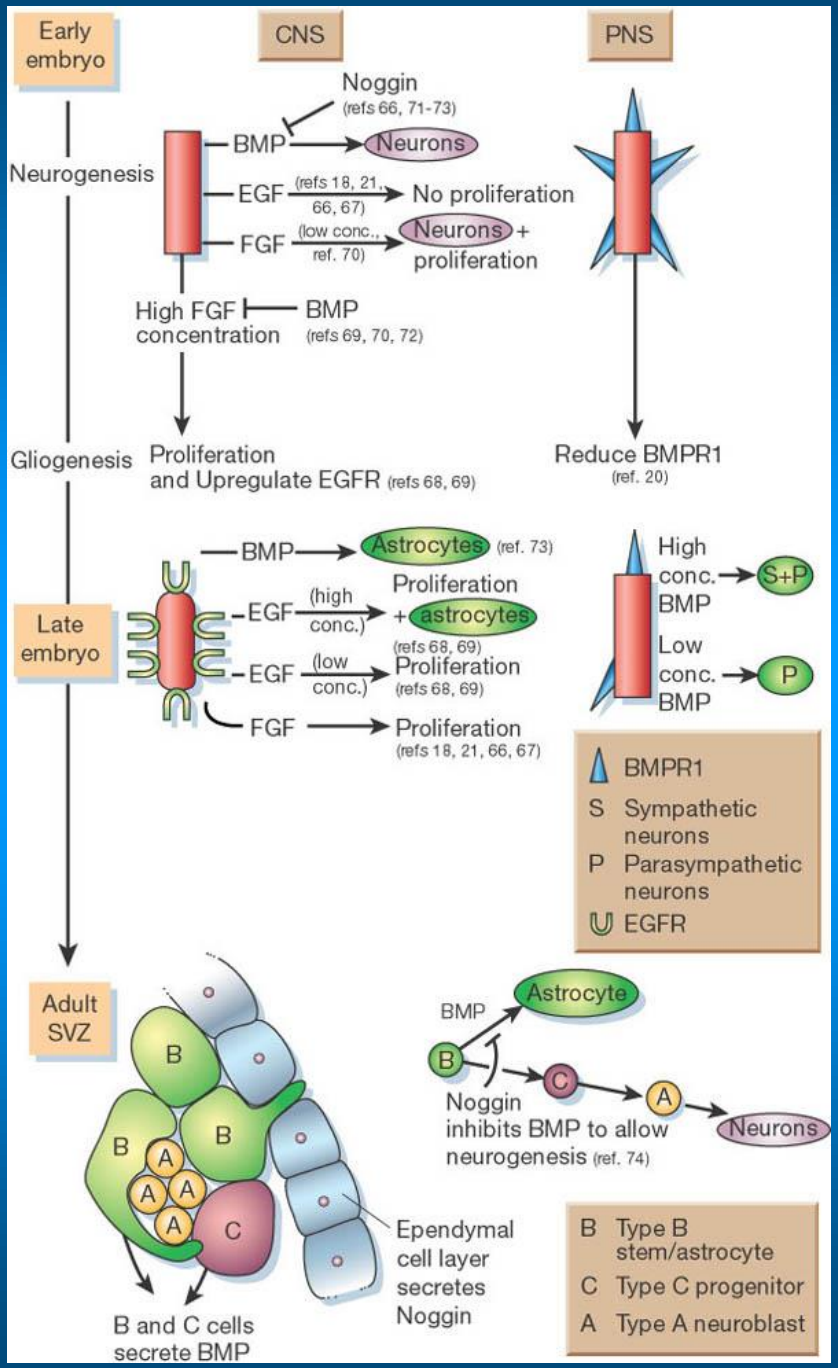


Staminali adulte: limitate nello spazio e nel tempo

Neurogenesi adulta





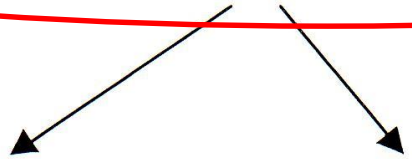


STAMINALI ADULTE

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, trasferimanto in coltura dei blastomeri, differenziamento in vitro

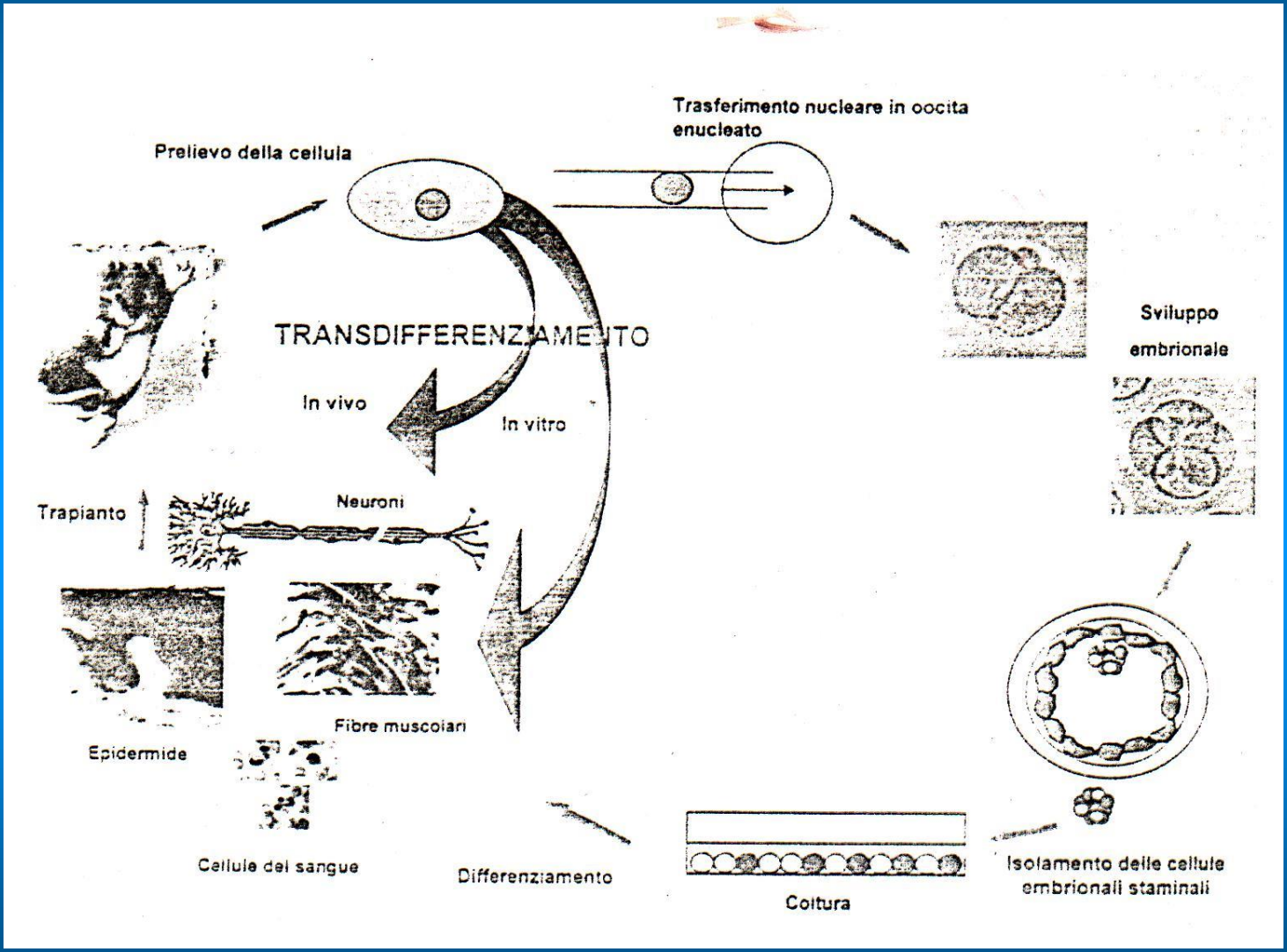
b) prelievo di cellule staminali da individuo adulto, amplificazione dei cloni cellulari in coltura e successivo differenziamento



Induzione del differenziamento in vitro verso la linea "parentale"

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

STAMINALI ADULTE



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

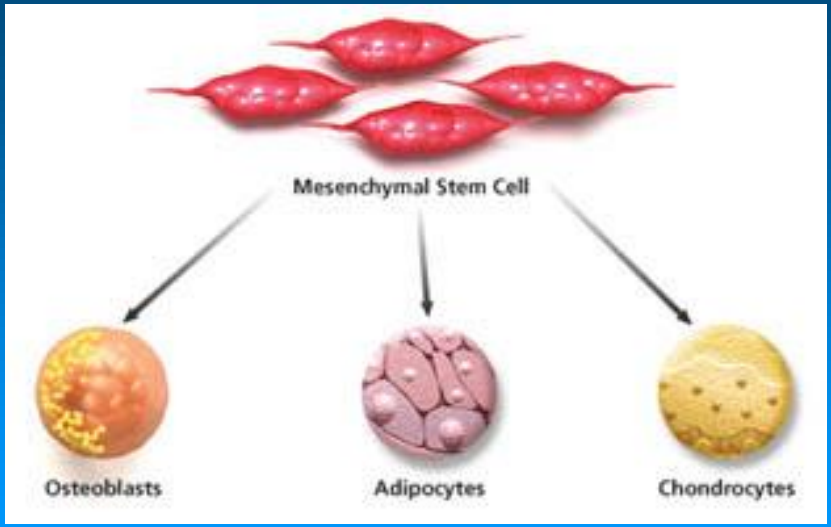
CS del sistema nervoso → possono originare glia e neuroni
Cellule del sangue
Cellule muscolari

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.

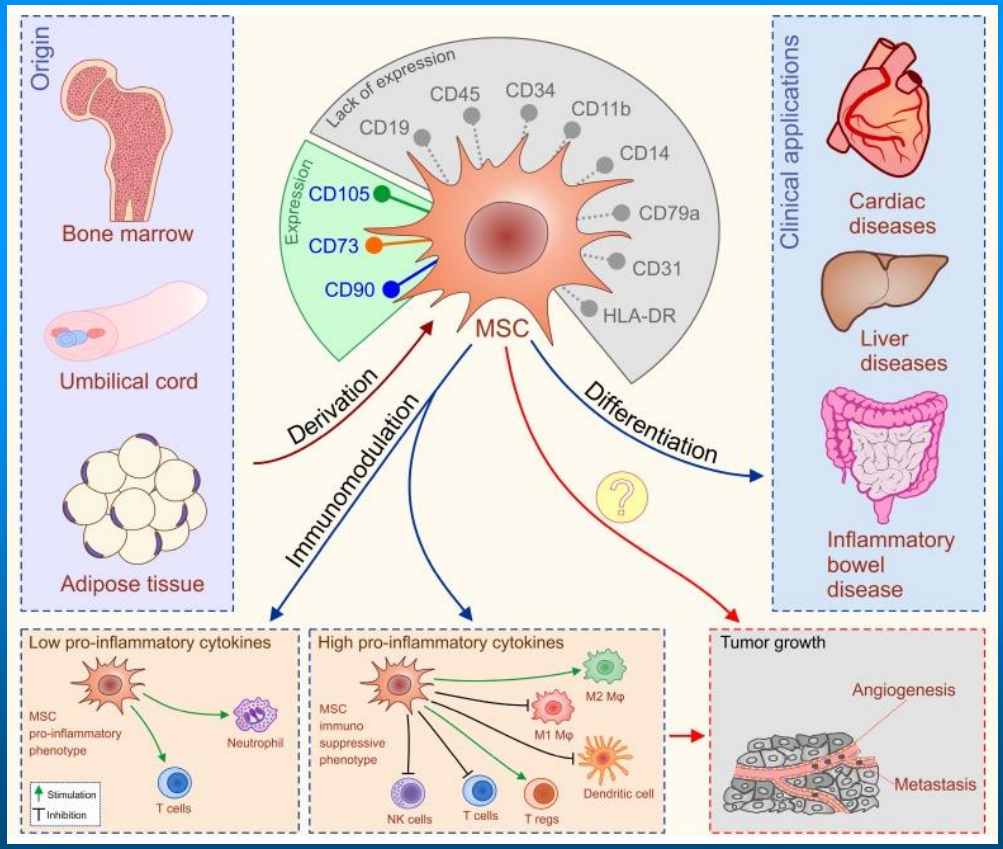
Viene così modificato il paradigma classico della multipotenza delle cellule staminali adulte intesa come capacità differenziativa limitata al proprio *lineage*. Questa definizione è stata sostituita dalla nuova teoria della "*developmental plasticity*", ossia la capacità di oltrepassare i confini differenziativi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

Mesenchimal Stem Cells



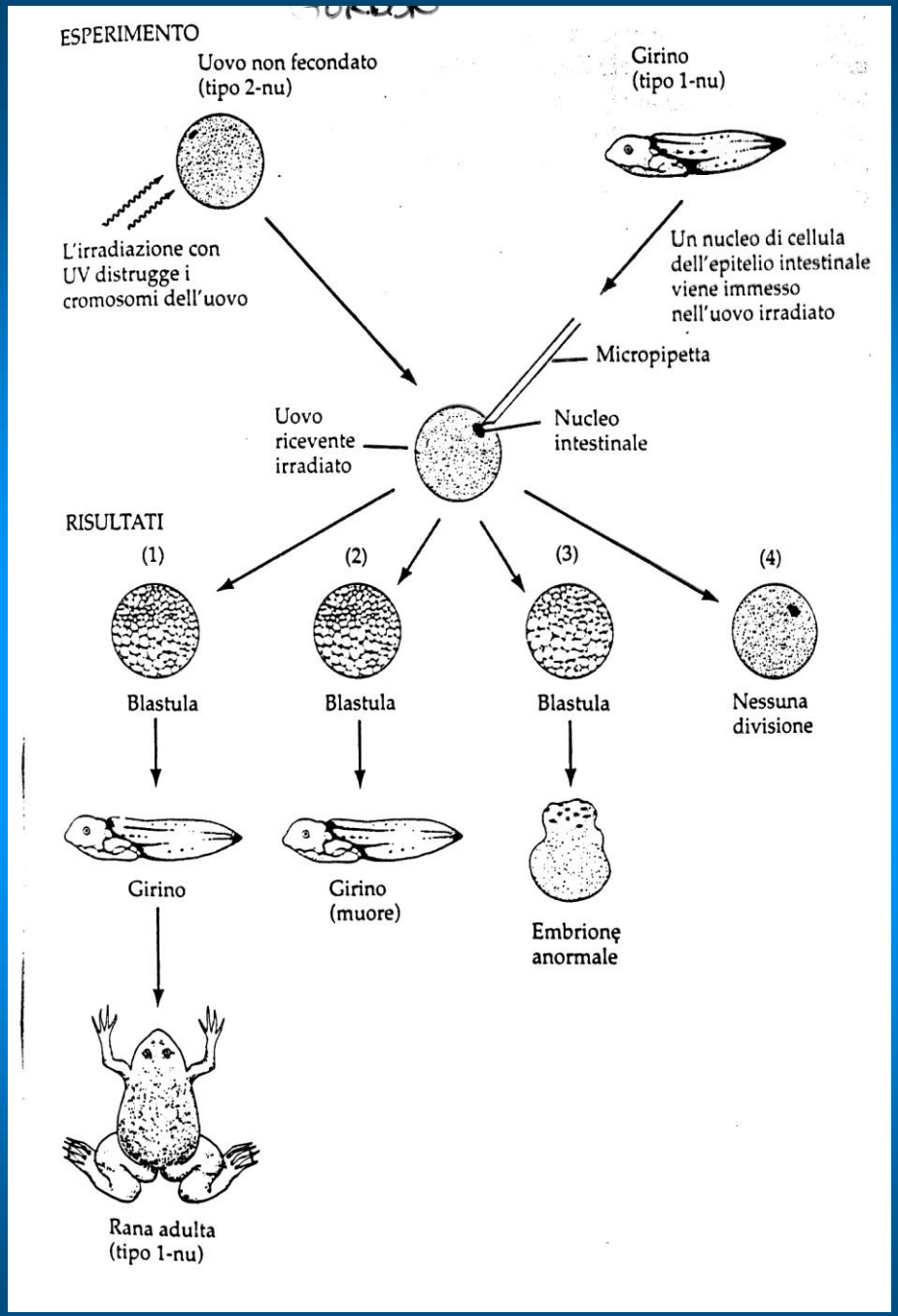
1. **Da midollo osseo**
2. **Cordone ombelicale**
3. **Sangue periferico**
4. **Placenta**
5. **Tessuto adiposo**

In particolar modo è stato osservato che le MSC sono:
- facilmente isolabili grazie alla loro capacità adesiva;
- facilmente separabili da altre
- 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).



Applicazioni delle cellule staminali

- Da mesenchimali adulte: rigenerazione di osso, cartilagini, muscolo
- Da staminali del cordone ombelicale: cellule ematopoietiche
- Da staminali epiteliali: (pelle, cornea)
- Staminali cerebrali (generare nuovi neuroni danneggiati) ?????

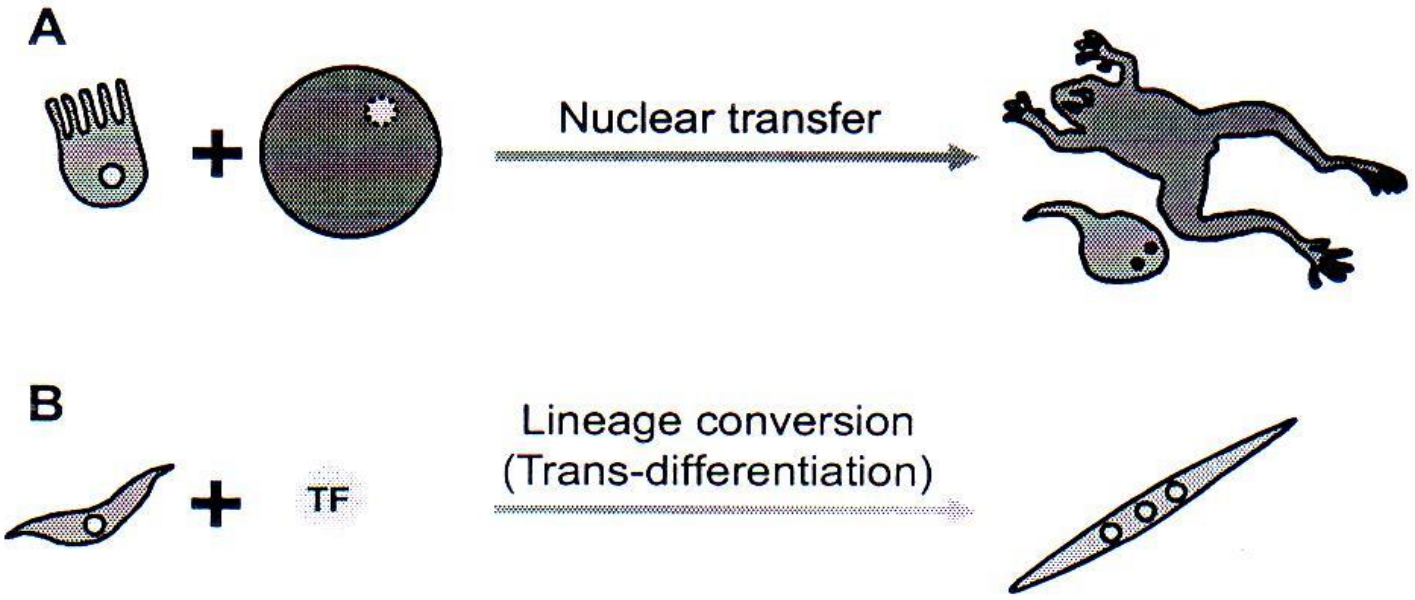


The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles

J. B. GURDON

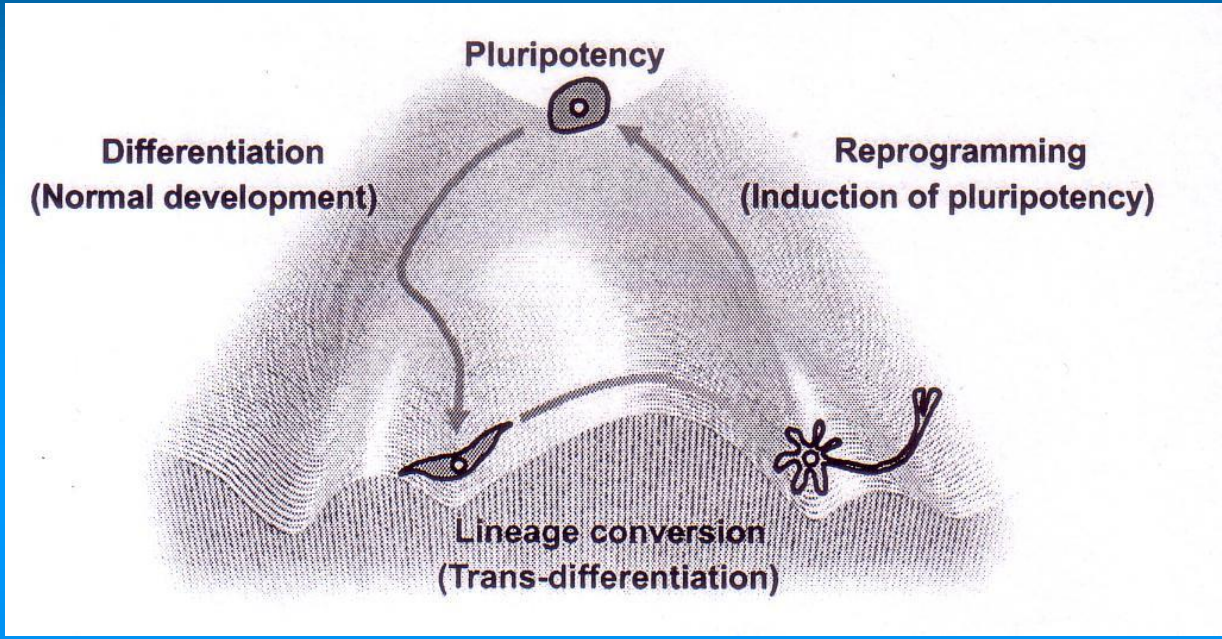
From the Embryology Laboratory, Department of Zoology, Oxford

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



E’ possibile far transdifferenziare le cellule terminalmente differenziate?

iPS (Yamanaka, 2006)



Fibloblasti di topo trasfettati con fattori trascrizionali (Sox2, Oct4, Kfl4; 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

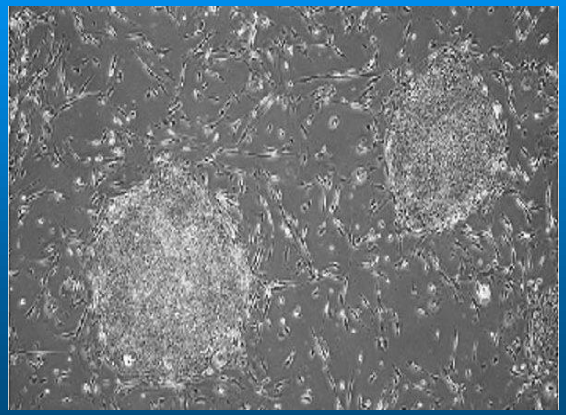
Vantaggi: si possono riprogrammare cellule mature
Svantaggi: non conosciamo il potenziale carcinogenico di queste cellule riprogrammate

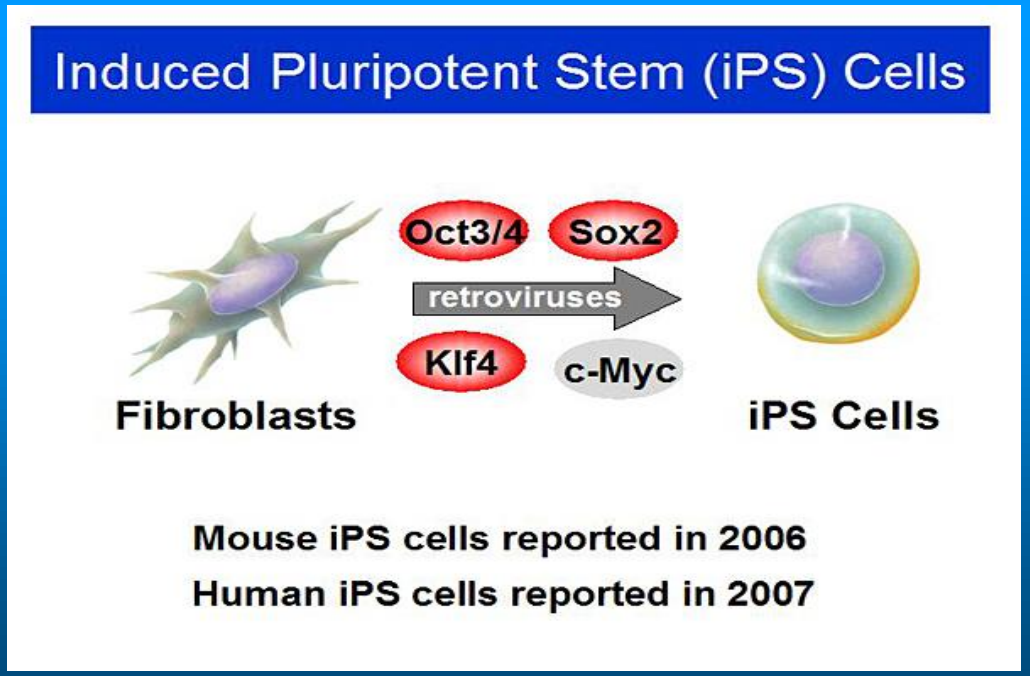
Cellule staminali iPS

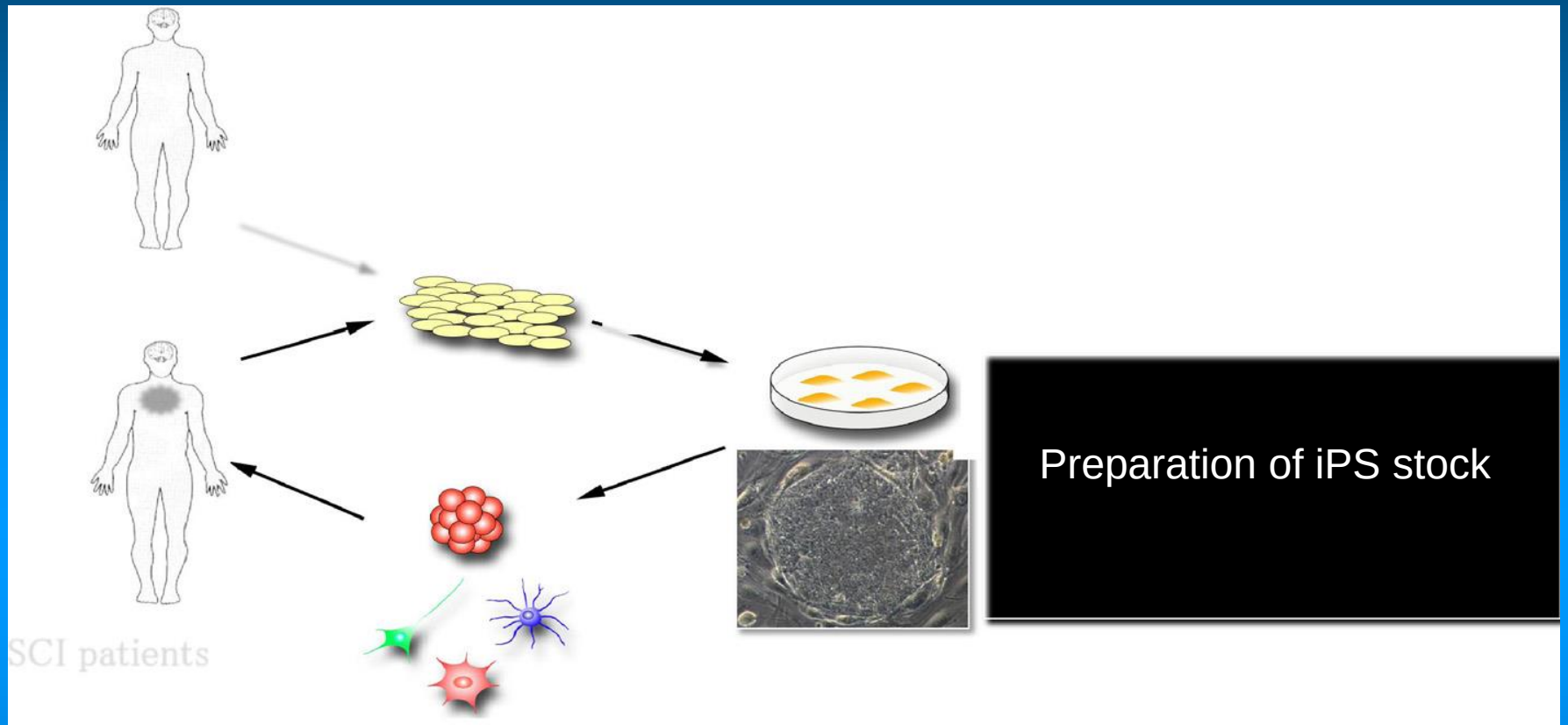
Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) sono cellule con caratteristiche simili a quelle delle cellule staminali embrionali ma vengono ottenute artificialmente in laboratorio da cellule adulte già differenziate.

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'autorinnovamento e la pluripotenza.



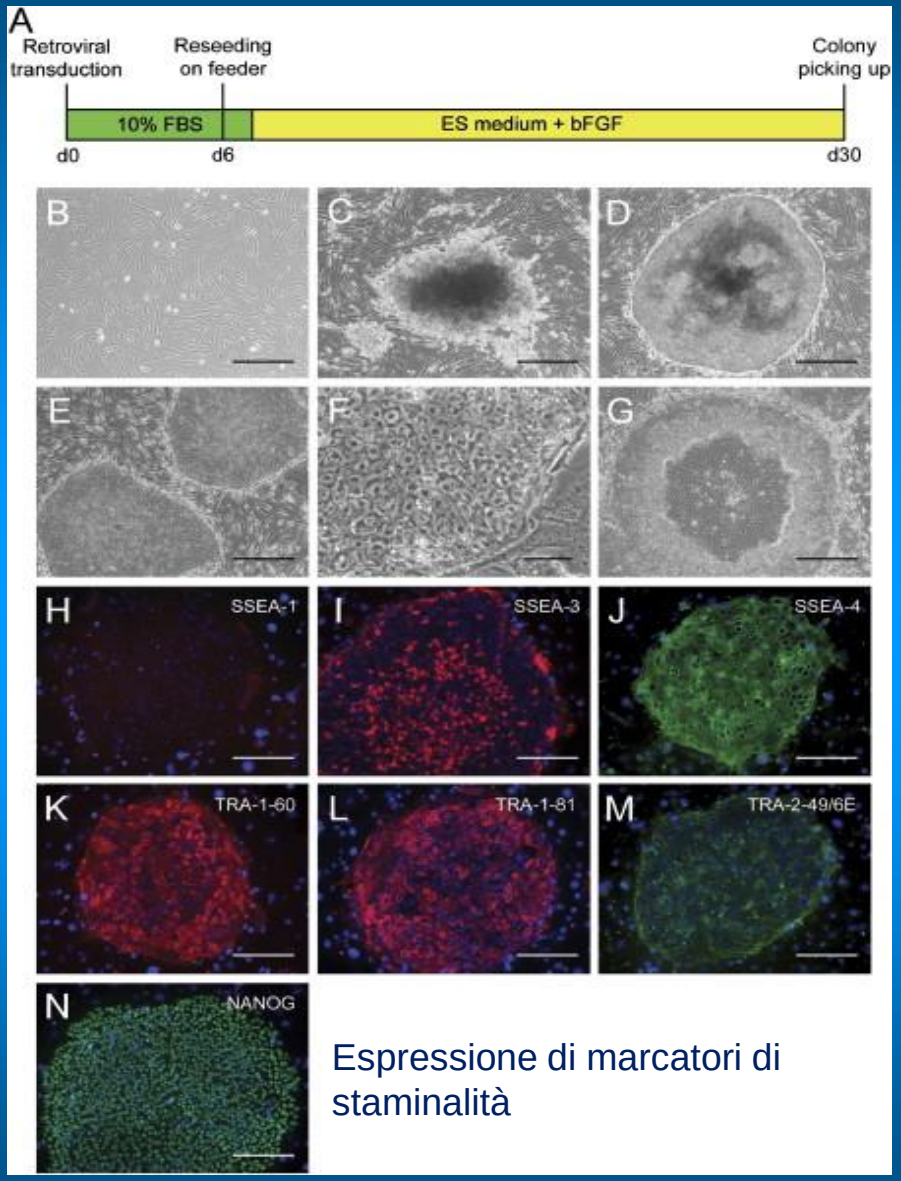




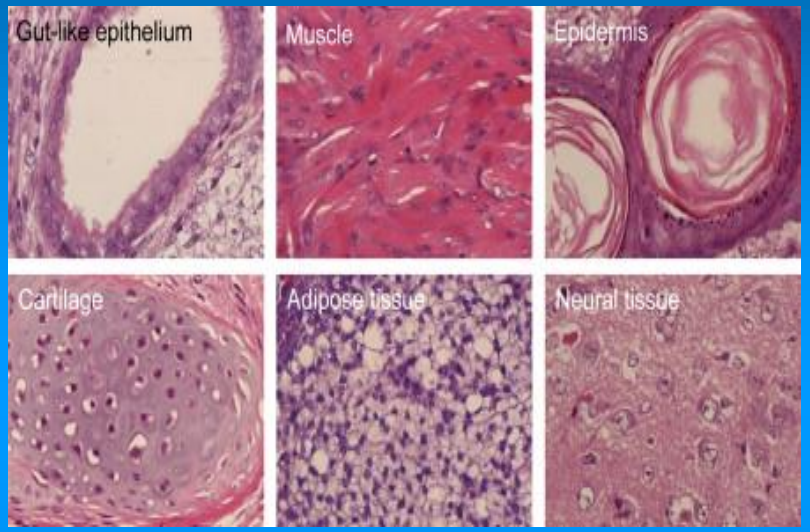


Preparation of clinical grade iPS-cell-derived NS/PCs stocks
(Okano Group in Keio University)
Neural differentiation and expansion of iPS-derived NS/PCs at the GMP level.
Quality control of clinical grade iPS-cell-derived NS/PCs.
Freeze and Stocks of clinical grade iPS-cell-derived NS/PCs.

Caratteristiche delle iPs

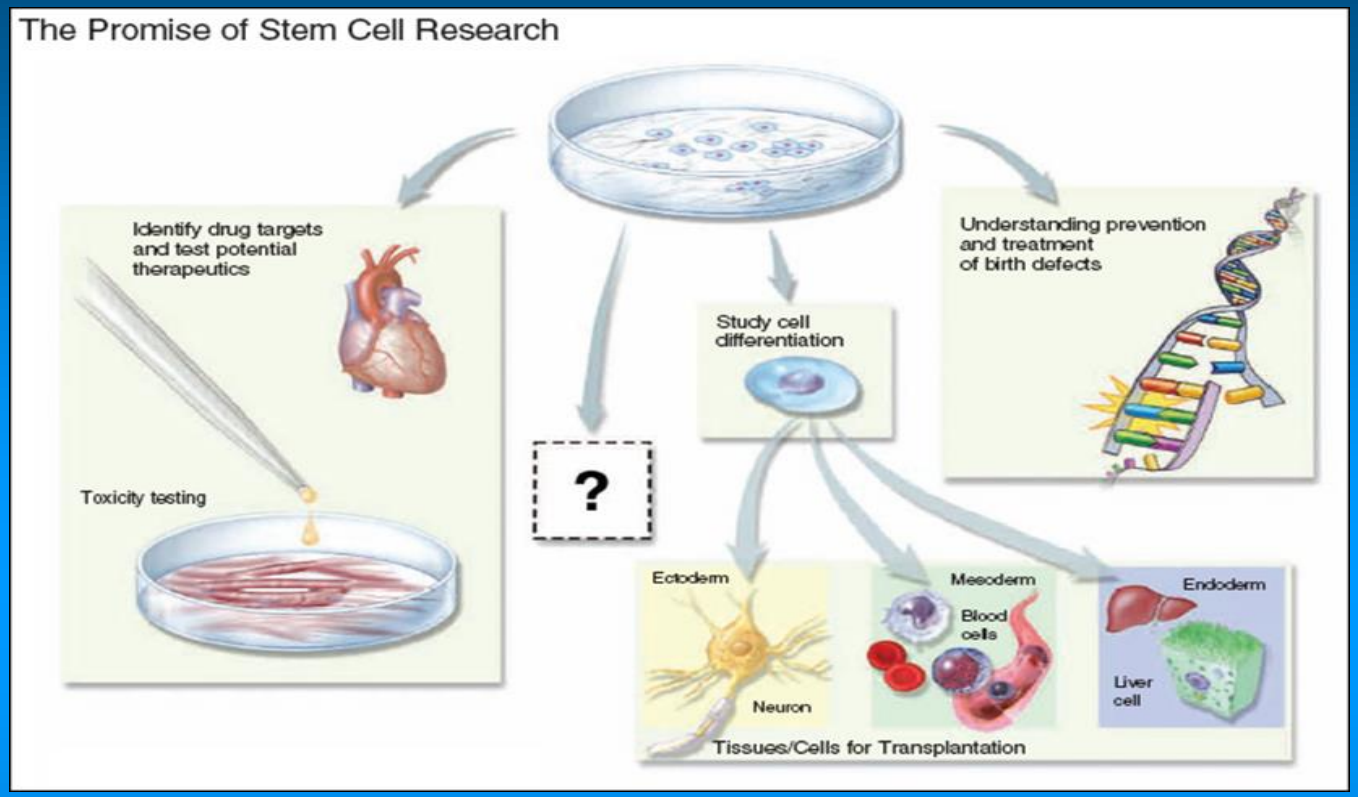


Espressione di marcatori di staminalità



Formazione di Teratomi

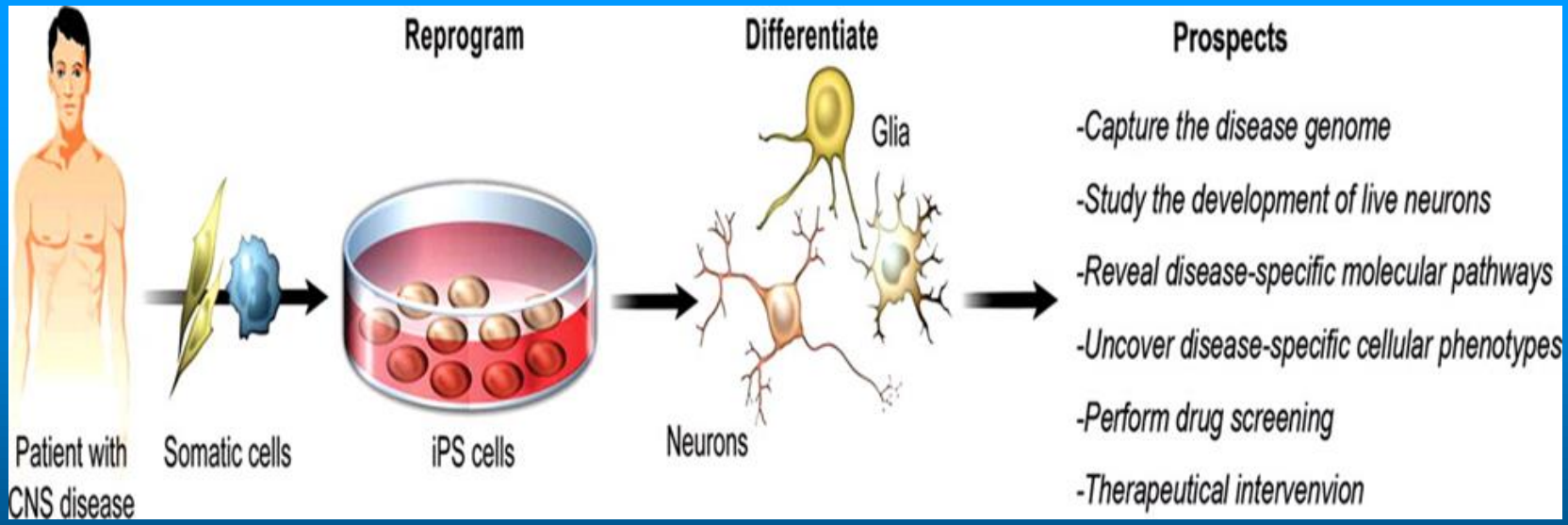
iPS e Medicina Rigenerativa



- **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**

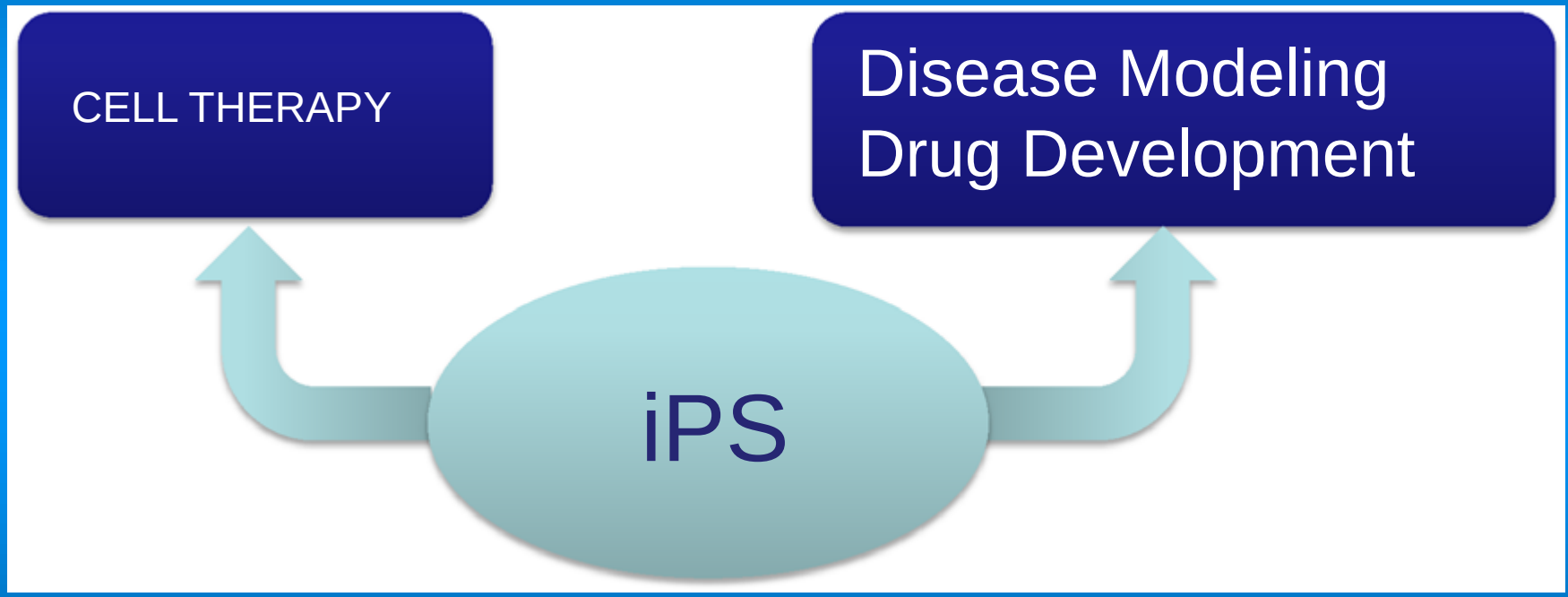
Applicazione delle iPS in patologie neurologiche

- 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

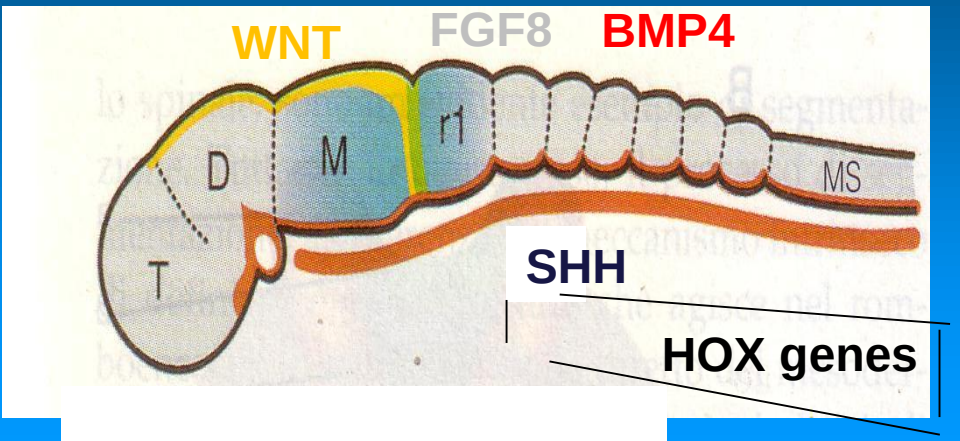


Spinal cord injury
Parkinson disease

ALS
Alzheimer
Parkinson



Neuralizzazione di cellule iPS

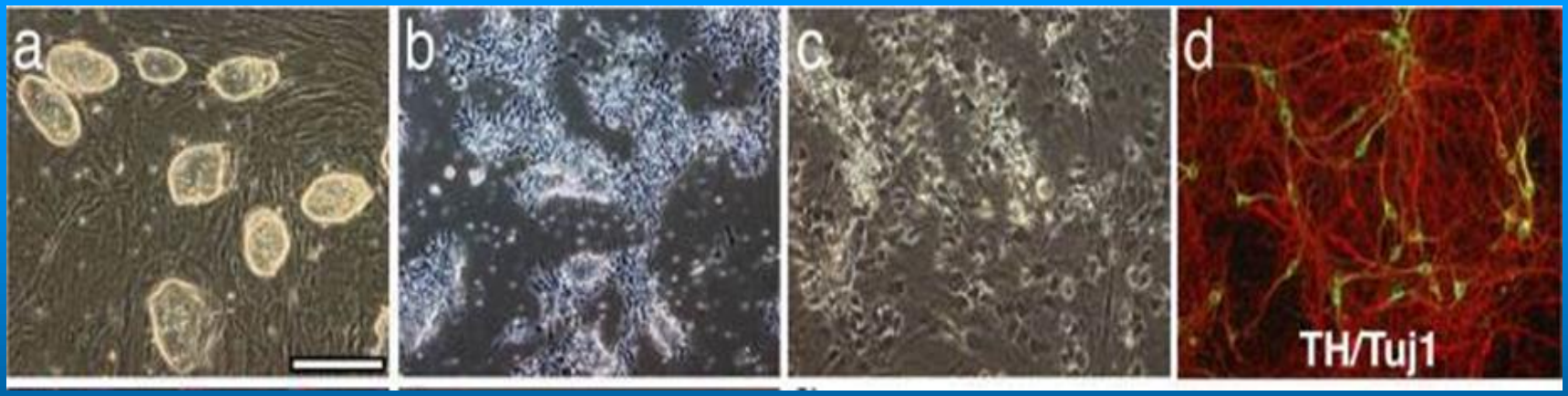


Fattori implicati nella neurogenesi embrionale

↓

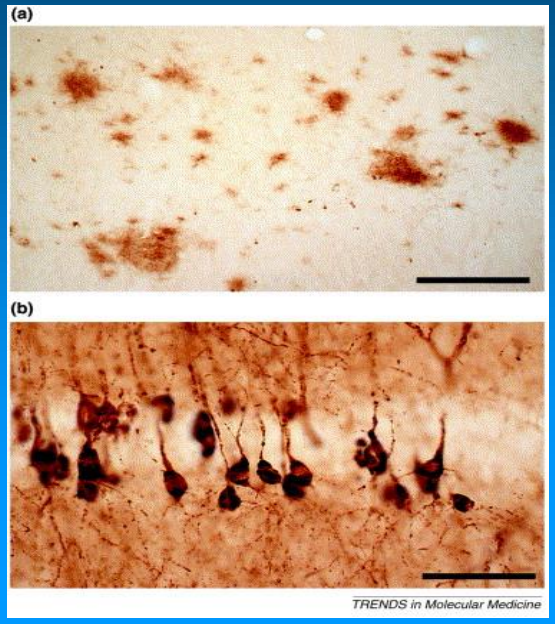
Differenziamento in neuroni di cellule iPS.

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



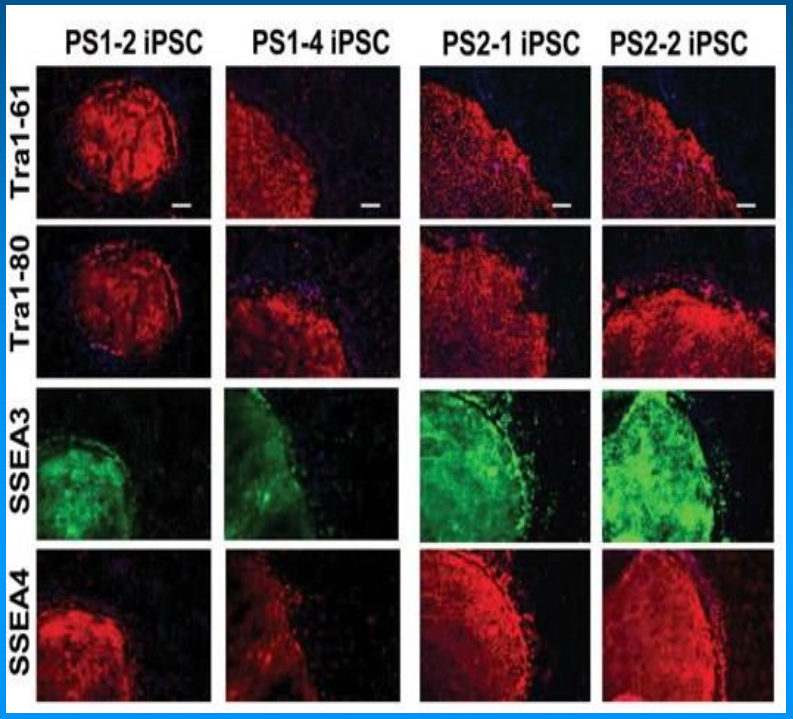
(Werning et al.; 2008).

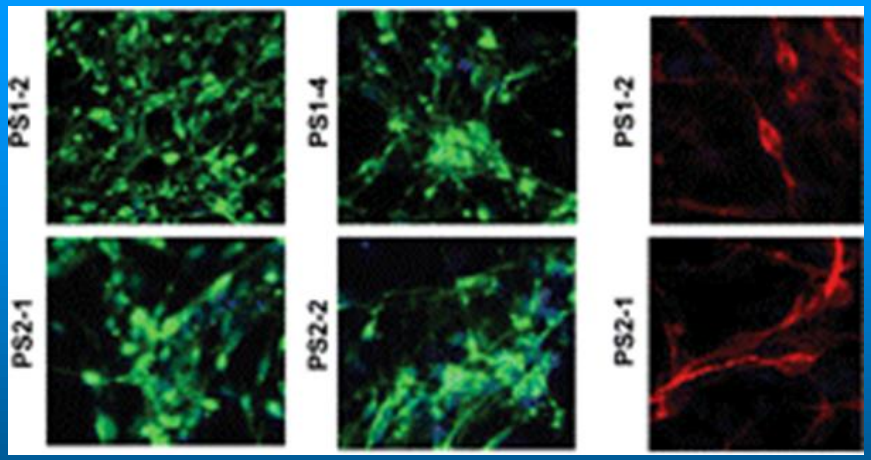
Patologia di Alzheimer



Accumulo di beta-amiloide

Depositi neurofibrillari





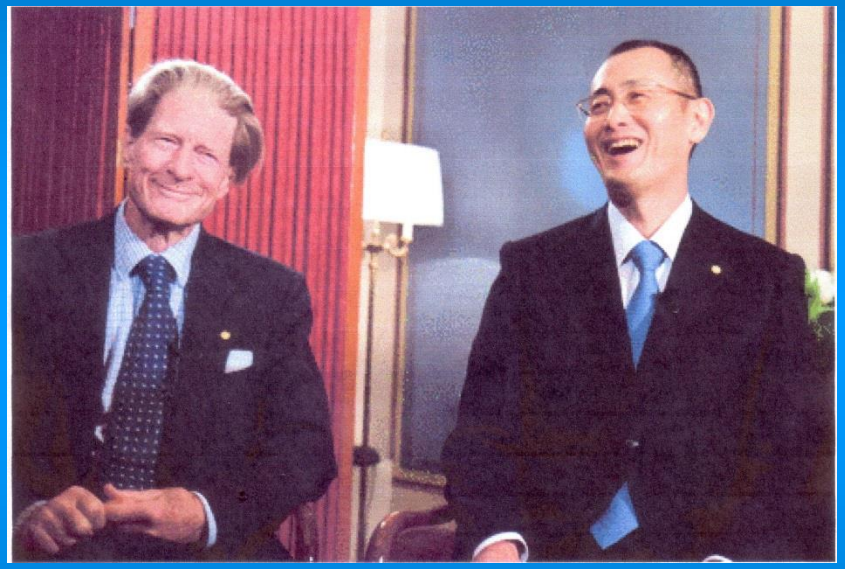
Fibroblasti di pazienti FAD con mutazionei PS1 e PS2→iPS →neuroni:

- Esprimono marcatori neuronali (beta-III tub, MAP2)
- secrezione di Aβ42 aumentata

Yagi et al. (2011))

Premio Nobel 2012

John Gurdon Shinya Yamanaka



Riprogrammare cellule mature (riprogrammando i nuclei) in cellule pluripotenti