

DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

In un organismo pluricellulare, il processo che conduce alla formazione di differenti tipi di cellule si definisce **differenziamento cellulare**. Il destino di ciascuna cellula è la combinazione di modelli coordinati di divisione, crescita e differenziamento cellulare, inclusa la morte cellulare programmata. Il processo di differenziamento è preceduto da una fase di determinazione cellulare, cioè l'indirizzamento di cellule ancora meristematiche (staminali, non differenziate) verso uno specifico programma differenziativo, che le porta a formare i diversi tessuti di un organo.

Al livello biochimico il differenziamento è il risultato di una attivazione genica differenziale, ed è spesso regolato dalla trascrizione di alcuni geni codificanti fattori di trascrizione. Singoli fattori di trascrizione controllano molti dei geni che specificano particolari comportamenti cellulari, agendo come regolatori principali del destino cellulare. Durante il differenziamento le cellule acquisiscono caratteristiche morfologiche, strutturali e funzionali differenti, anche influenzate da fattori esterni come la luce, la temperatura, la gravità e i nutrienti. Nonostante la grande distanza evolutiva tra i regni vegetale e animale, le cellule staminali in entrambi i regni risiedono in contesti cellulari specializzati chiamati **nicchie staminali**. La presenza di nicchie staminali nelle piante e negli animali probabilmente deriva dall'evoluzione convergente che ha portato a condividere la necessità di mantenere una riserva di **cellule staminali** capaci di autoreplicarsi.

Il mantenimento dello stato staminale o l'induzione al differenziamento, in entrambi i sistemi, sono regolati da una combinazione di segnali intrinseci alla nicchia staminale e provenienti dal microambiente circostante. Le nicchie staminali sono formate dalle cellule staminali stesse e dalle cellule differenziate che le circondano. Benjamin Ohlstein e collaboratori (2004) definiscono **la nicchia come una specifica posizione in un tessuto dove le cellule staminali possono risiedere per un periodo indefinito e produrre cellule figlie mentre si autoreplicano. Nelle piante le nicchie staminali sono localizzate entro i meristemi presenti nell'apice radicale e vegetativo.**

Nelle piante le cellule staminali possono essere formate *ex novo a partire da tessuti* differenziati se sottoposti a relativamente semplici manipolazioni (coltura *in vitro*). Al contrario negli animali le cellule differenziate sono molto più rigidamente bloccate nel loro stato. Cellule vegetali coltivate, totipotenti, non mostrano le normali caratteristiche di autoreplicazione e divisione asimmetrica proprie delle cellule staminali.

Quali sono allora le vere cellule staminali in una pianta?

La risposta è che le cellule staminali si trovano nelle strutture meristematiche (apice vegetativo e radicale) e che lo sviluppo continuo delle piante durante il loro ciclo di vita è dipendente da questa riserva di cellule staminali. Una differenza fondamentale infatti tra piante e animali è che nelle piante la formazione degli organi non avviene esclusivamente nell'embrione ma continua post-embryionalmente grazie ai meristemi in grado di rigenerare foglie, fusto, radici e fiori.

Le cellule che circondano le nicchie staminali vegetali inviano segnali per mantenere le cellule staminali in uno stato indifferenziato.

Lo sviluppo post-embrionale delle piante è dipendente dal mantenimento **dell'apice vegetativo (SAM) e radicale (RAM)** e dai meristemi vascolari contenenti cellule staminali tessuto-specifiche.

Cellule meristematiche nel SAM producono cellule per il continuo sviluppo di nuovi organi, foglie, fusto fiori e frutti

Cellule meristematiche nel RAM provvedono alla formazione delle cellule per il continuo sviluppo del sistema radicale.

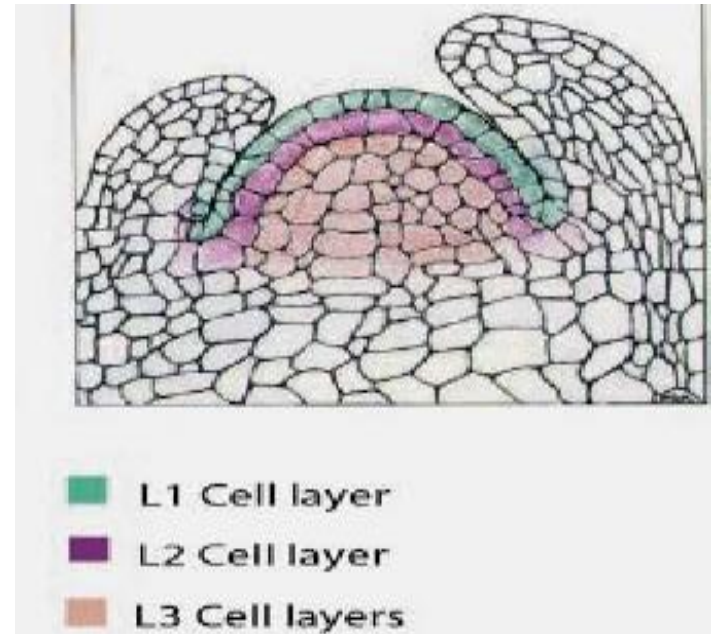
ORGANIZZAZIONE DEL SAM

Tre distinti strati di cellule

L1: porta alla formazione di strato epidermico

L2: Subepidermico

L3: lo strato più interno



Necessità di comunicazioni fra regioni del SAM



Per coordinare il differenziamento

La dimensione della nicchia ed i suoi confini sono mantenuti costanti da un sistema di segnalazione molecolare fra il centro organizzatore della nicchia (OC), caratterizzato dall'espressione del gene WUSCHEL e le cellule circostanti dove si esprimono i geni del complesso CLAVATA 1-2-3. Il gene WUS è represso da segnali negativi che si originano dalle cellule staminali che esprimono il gene CLV3. CLV3 agisce con CLV1 e CLV2. CLV3 si esprime nella tunica, CLV1 e CLV2 nello strato L3 (iniziali del corpus). I 3 geni CLV agiscono insieme per limitare la proliferazione delle cellule staminali indotte da WUS. SHOOTMERISTEMLESS (STM) è espresso nelle cellule del cono vegetativo assicurando che rimangano meristematiche, inibisce cioè il loro differenziamento. Nei primordi fogliari invece, STM è inibito dal gene AS1 che porta al differenziamento delle foglie. Il rapporto antagonista tra STM ed AS1 serve quindi a separare l'attività del cono vegetativo dallo sviluppo dei primordi delle foglie e dei rami

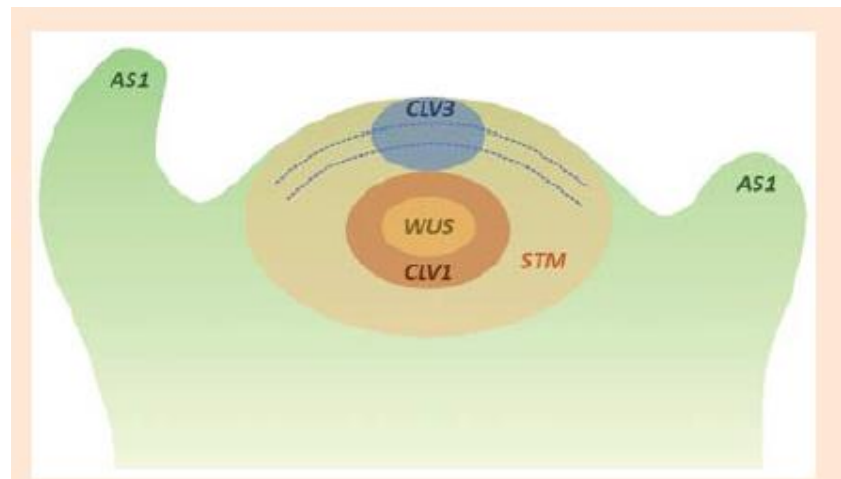


FIGURA 8.3.1

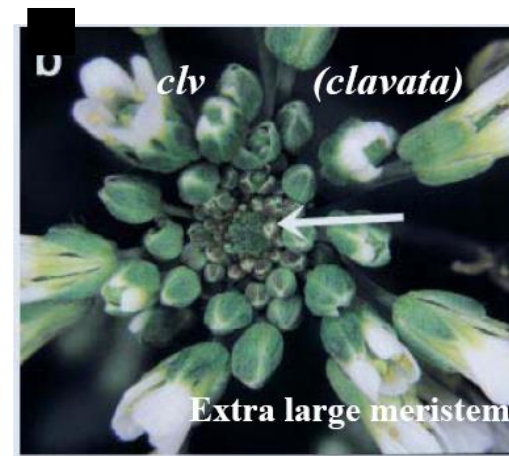
Rappresentazione schematica di un apice vegetativo. Sono rappresentati i geni che mantengono la nicchia staminale e che portano al differenziamento dei primordi delle foglie e dei rami. CLAVATA 1-2-3 (CLV); WUSCHEL (WUS); SHOOTMERISTEMLESS (STM); ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) (disegno di A. Valletta).

In *Arabidopsis* il SAM è costituito da circa 100 cellule. **In *Arabidopsis* le cellule staminali sono mantenute da segnali tra le cellule staminali ed il centro organizzatore della nicchia (OC), formato da un gruppo di cellule poste subito sotto le staminali. Le cellule OC esprimono il gene *WUSCHEL*. (*WUS*) che codifica un fattore di trascrizione che deve essere essenziale per il mantenimento dello stato staminale,** dal momento che nessuna cellula staminale è formata e mantenuta nei mutanti deficienti di *WUS*. Gli apici di mutanti *WUS* arrestano prematuramente il loro sviluppo, si formano altri apici in modo disordinato ed il fenotipo della pianta diventa basso e cespuglioso. Una mutazione in uno dei 3 geni porta ad un graduale accumulo di cellule indifferenziate nel SAM e mancato differenziamento delle cellule periferiche con produzione di organi in sovrannumero. Così il bilanciamento dinamico regolato da queste cellule e da quelle del OC controllano strettamente il numero delle cellule staminali nella nicchia del SAM.

STUDI DI MUTANTI

WUS è il gene responsabile per il funzionamento dell'apice del germoglio e del suo mantenimento, genera poche cellule del sam. I mutanti *wus* mostrano un fenotipo di pianta basso e cespuglioso.

I geni *CLAVATA* 1,2,3 sono necessari per limitare le dimensioni della zona centrale del doma. Una mutazione in uno dei 3 geni porta ad un graduale accumulo di cellule indifferenziate nel sam e mancato differenziamento delle cellule periferiche. Porta alla produzione di organi in sovrannumero.



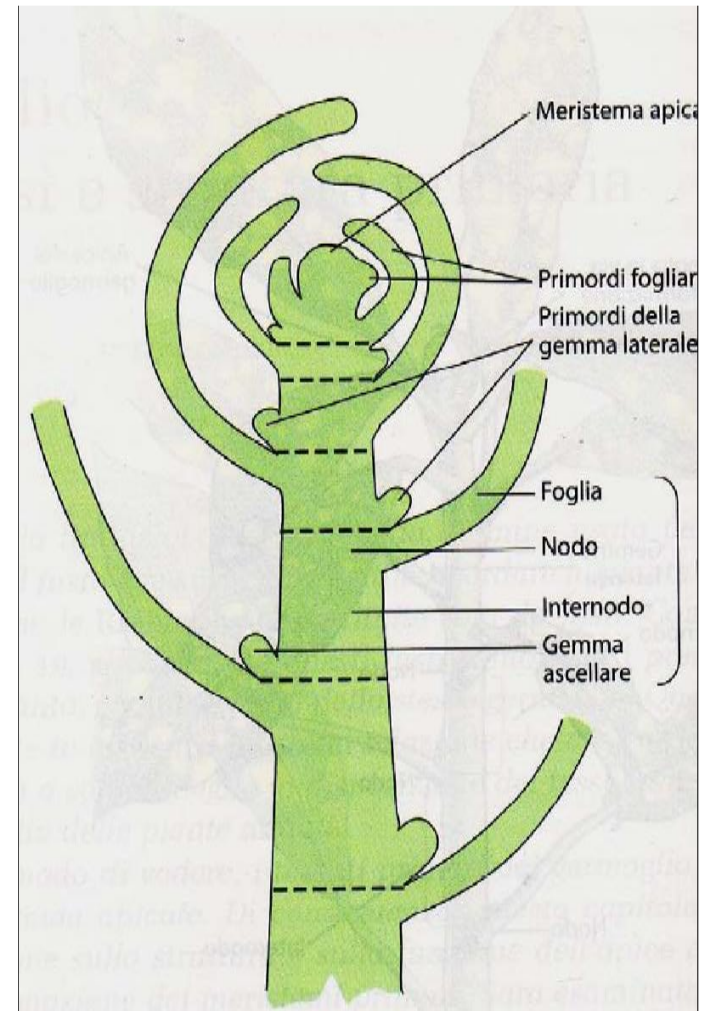
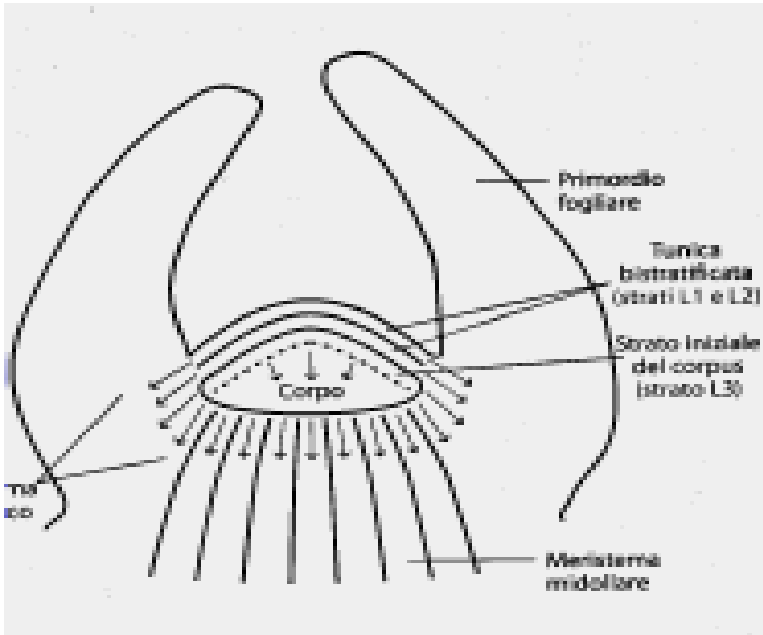
Questi geni interagiscono per regolare il destino e il mantenimento delle cellule staminali

Il meristema apicale è protetto dagli abbozzi fogliari

Organizzazione tunica-corporis del meristema apicale

Tunica: 2 strati periferici di cellule (L1 e L2) a divisione perpendicolare rispetto al superficie del meristema (divisioni anticlinali) responsabili dell'accrescimento superficiale senza aumento degli strati cellulari

Strato interno della tunica (L3): divisione su più piani



Corpus: massa di cellule racchiusa dalla tunica a divisione parallela rispetto al superficie del meristema (divisioni periclinali)

Responsabile dell'accrescimento del germoglio

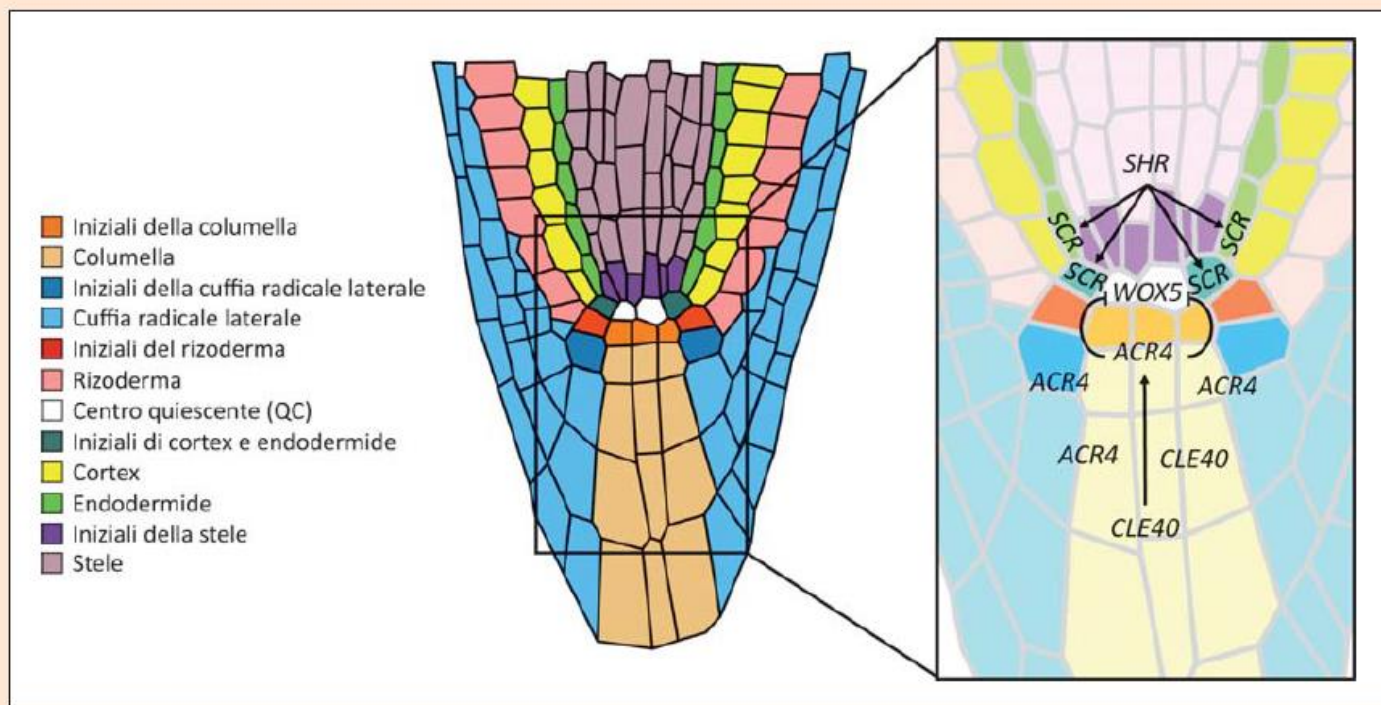


FIGURA 8.3.2

A sinistra è mostrata la rappresentazione schematica dell'apice radicale, del centro quiescente e delle cellule che vanno incontro al differenziamento dei tessuti. Nella figura di destra sono indicati i geni che controllano la nicchia staminale e le cellule derivate. *SHR*: *SHORTROOT*; *SCR*: *SCARECROW*; *WOX5*: *WUSHEL-RELATED HOMEBOX*; *ACR4*: *ARABIDOPSIS CRINKLY*; *CLE40*: *CLAVATA* (disegno di A. Valletta).

Le cellule staminali che formano i tessuti della radice si trovano nella zona meristemica dell'apice radicale. Il segnale che le mantiene allo stato staminale si origina da un piccolo gruppo di cellule che risiede nel centro quiescente (QC). In Arabidopsis la nicchia staminale comprende le cellule del QC (mitoticamente poco attive) e le cellule iniziali che lo circondano. Ogni cellula iniziale si divide asimmetricamente per dare origine sia alle cellule che formeranno il corpo primario della radice sia ad altre cellule necessarie per il mantenimento della nicchia stessa.

L'informazione posizionale necessaria per il mantenimento di QC è fornita dall'azione combinata di due fattori di trascrizione, SHORT-ROOT (SHR) e SCARECROW (SCR) appartenenti alla famiglia GRAS. SCR si esprime nel OC e nelle cellule corticali. SHR è richiesto per l'espressione di SCR e non viceversa. SHR e SCR agiscono sui geni PIN (trasportatori dell'auxina). La dimensione della zona di divisione dell'apice e della zona di allungamento della radice sono regolati dalla distribuzione dell'auxina, che a sua volta è regolata dalle proteine trasportatrici PIN. Tutti i tessuti che formano il corpo primario della radice prendono origine da cellule staminali poste in una **posizione specifica**.

Le cellule derivate devono dividersi secondo piani prestabiliti, parallelamente o perpendicolarmente alla superficie dell'organo, secondo il loro programma di sviluppo.

Le cellule staminali (conosciute come **cellule iniziali**) **adiacenti a QC** producono file longitudinali di cellule che formeranno i tessuti della corteccia e dell'endoderme. Le cellule prodotte verso il basso formeranno la cuffia radicale, mentre quelle che si trovano sopra a QC daranno luogo a cilindri concentrici di cellule che formeranno i tessuti vascolari, circondate da un anello di cellule iniziali del periciclo.

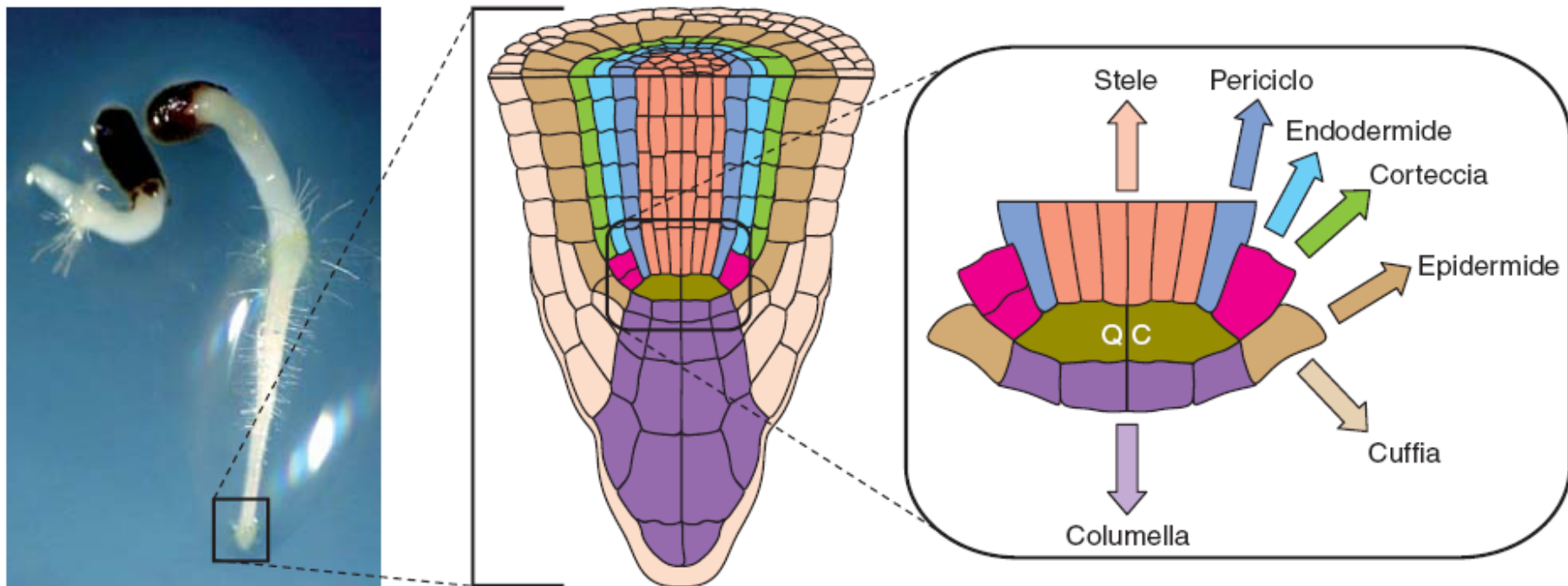


Figura 10.3

Rappresentazione schematica dell'apice radicale in sezione longitudinale. A sinistra, semi in germinazione da cui emerge la radice primaria. Al centro, schema dell'apice radicale. A destra, particolare dell'apice, in cui sono evidenti due cellule del centro quiescente (QC). Le cellule staminali adiacenti a QC producono file longitudinali di cellule che formeranno i tessuti della corteccia e dell'endodermide. Le cellule prodotte verso il basso formeranno la cuffia radicale, mentre quelle che si trovano sopra a QC daranno luogo a cilindri concentrici di cellule che formeranno i tessuti vascolari, circondate da un anello di cellule iniziali del periciclo.

Studi di **ablazione laser hanno mostrato che QC** mantiene lo stato di cellule staminali delle cellule circostanti inibendo il loro differenziamento. Recentemente è stato dimostrato che un gene denominato *RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR)* è *cruciale* per la regolazione del mantenimento delle cellule staminali del RAM nelle piante. La proteina RBR è l'omologo della proteina soppressore del tumore nel retinoblastoma che reprime i fattori di trascrizione coinvolti nella proliferazione cellulare.

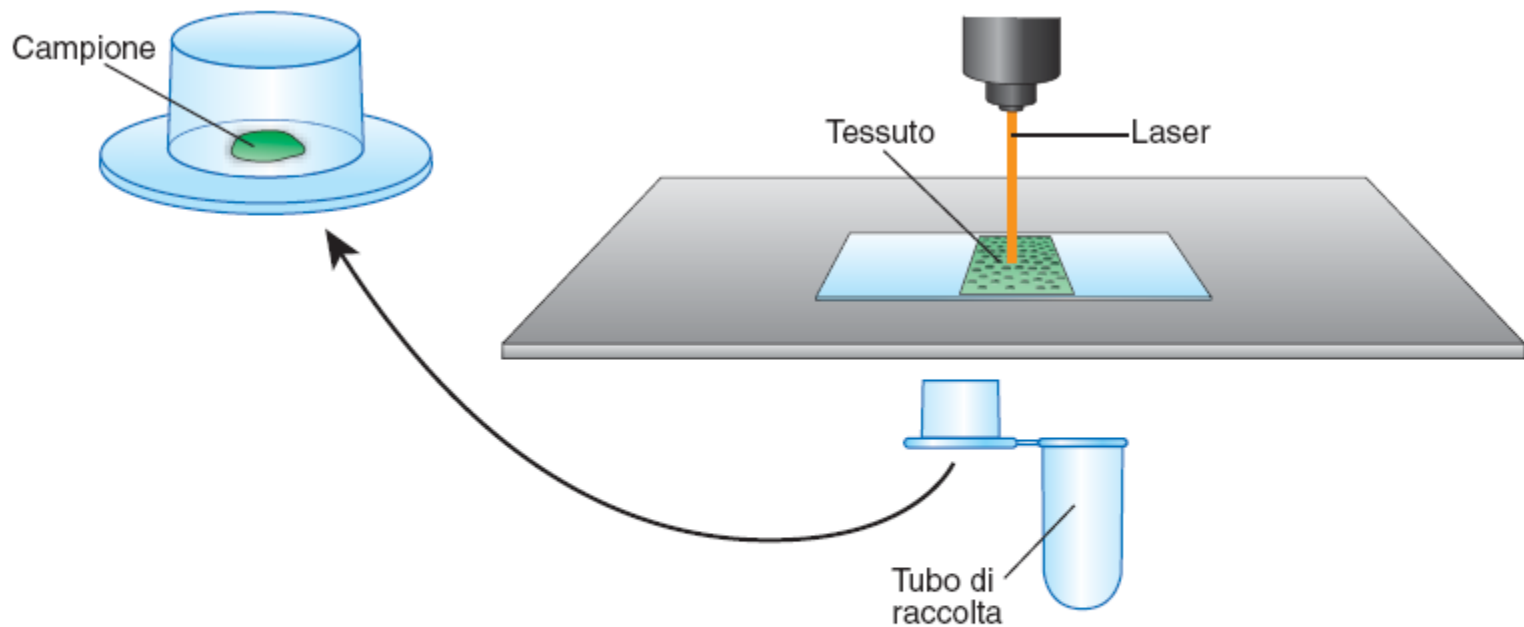
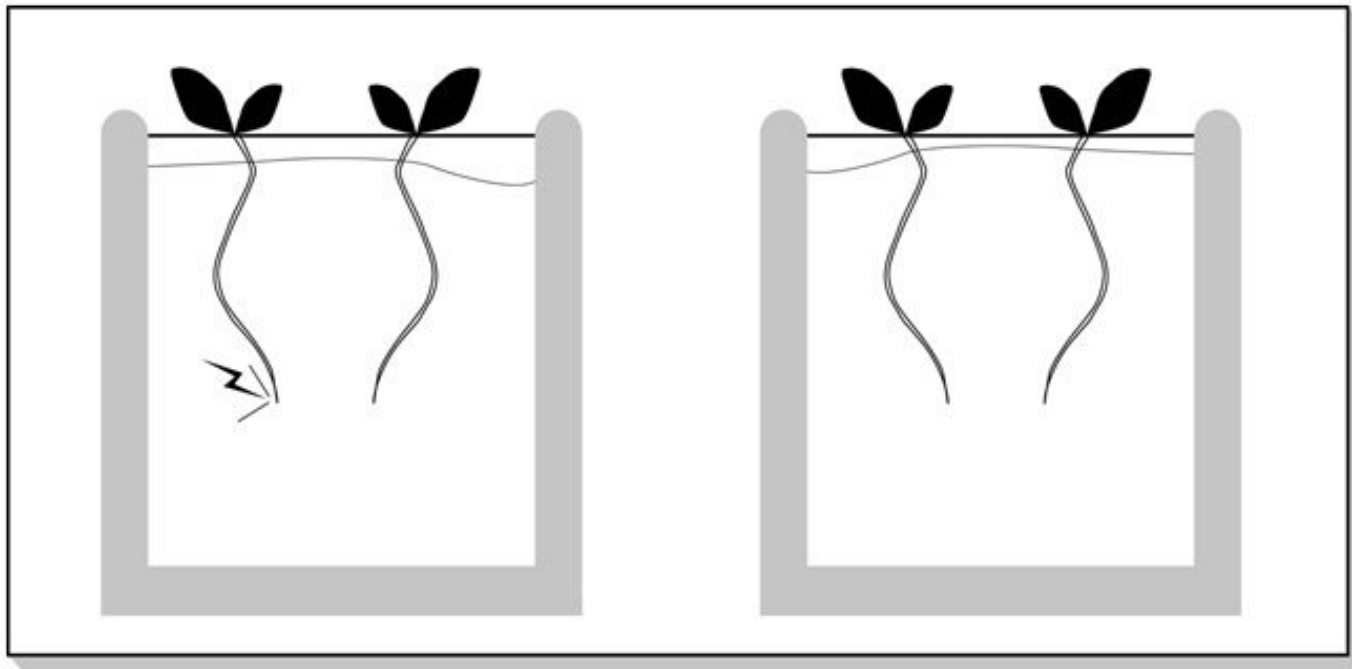


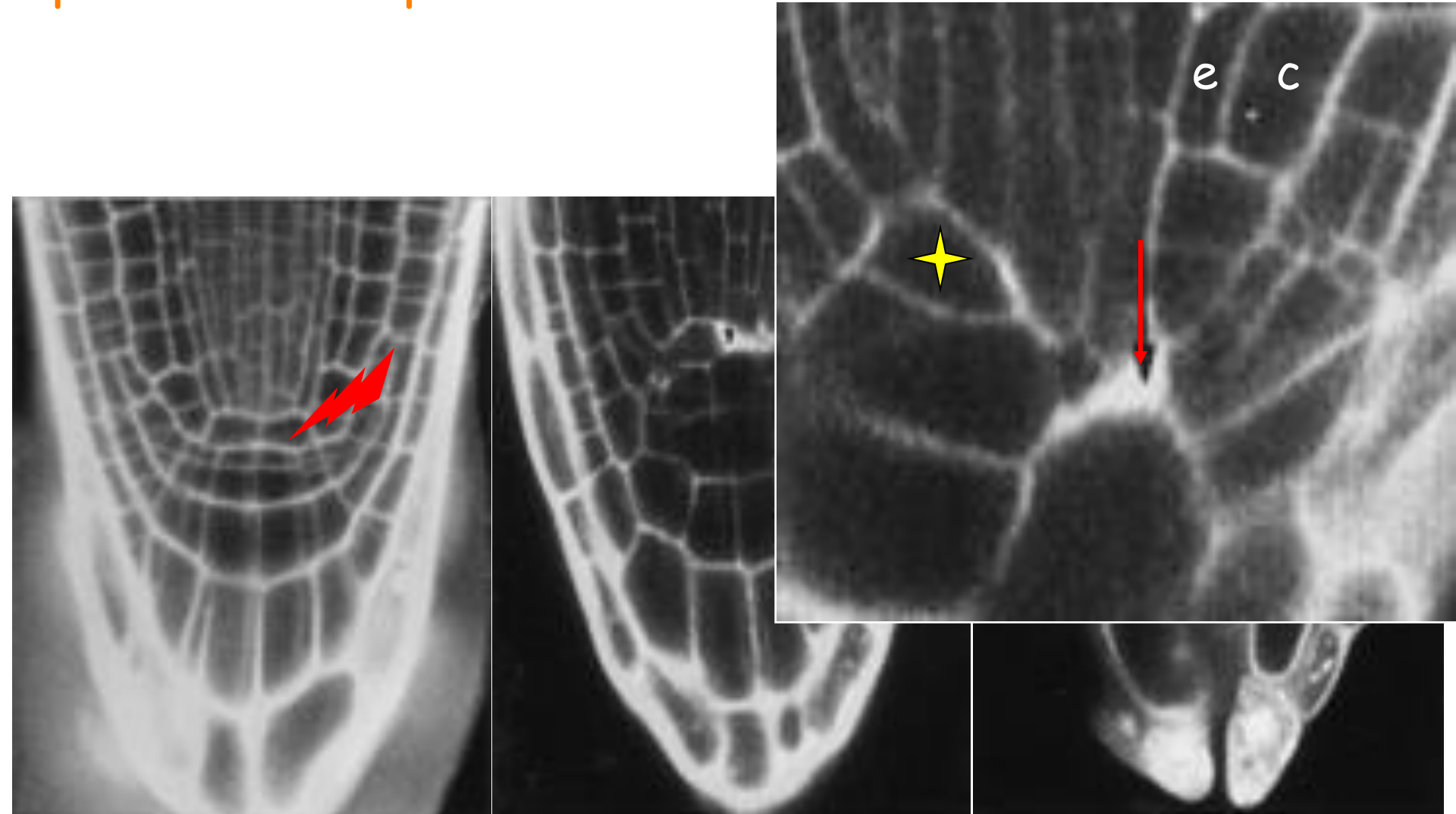
Figura 10.4

Microdissezione laser per isolare un frammento di tessuto. Il frammento di tessuto viene raccolto in un tubo e poi trattato per essere osservato al microscopio o per isolare DNA, RNA o proteine senza l'interferenza delle cellule vicine.

Con il microscopio confocale è possibile convogliare un raggio laser in modo così preciso da distruggere una singola cellula appartenente anche a tessuti sottostanti l'epidermide.



In seguito all'ablazione di una cellula del centro quiescente una cellula del tessuto provascolare prende il suo posto cambiando il suo destino.



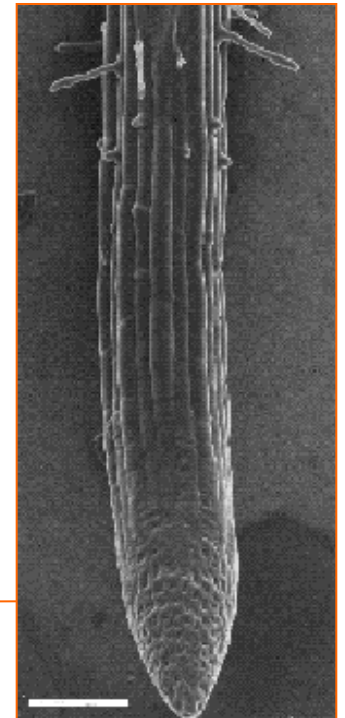
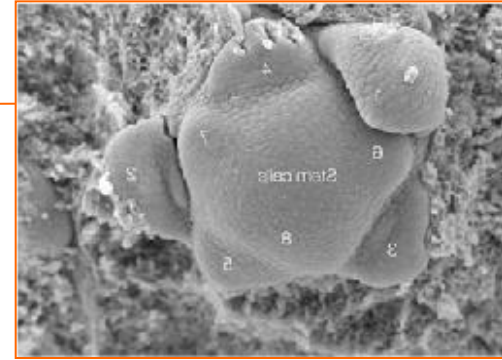
Accrescimento indeterminato
e determinato

Differenza morfologica stadio
giovanile e adulto nelle piante

Organizzazione modulare nelle
piante non modulare nei
vertebrati

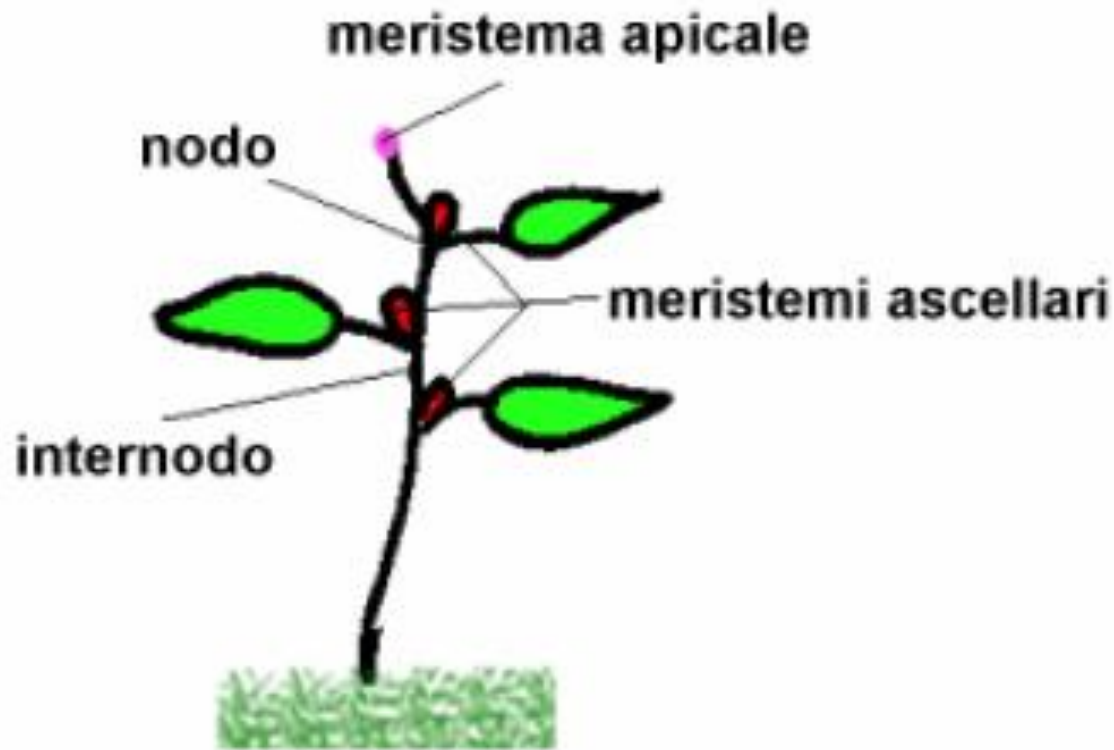


Una differenza fondamentale tra piante e animali è che nelle piante la formazione degli organi non avviene esclusivamente nell'embrione ma continua post-embriionalmente da regioni specializzate chiamate **meristemi**, dai quali origina tutta la struttura adulta della pianta, foglie fiori, fusto, e radici.



CRESCITA MODULARE

La maggior parte delle strutture che costituiscono una pianta adulta vengono formate dopo l'embriogenesi grazie all'attività dei meristemi.



MERISTEMI

MERISTEMA GERMOGLIO

MERISTEMI APICALI

MERISTEMA RADICALE

- I due meristemi apicali (inizialmente a contatto nelle prime fasi embrionali) si allontanano sempre più l'uno dall'altro in due direzioni opposte
- I meristemi non si espandono nè si differenziano e rimangono totipotenti per tutta la vita della pianta
- Ogni volta che una cellula meristemica si divide, una manterrà la totipotenza rimanendo meristemica, mentre l'altra si differenzierà e perderà la totipotenza

La permanenza di meristemi fa della pianta un organismo ad *accrescimento aperto* (o *indefinito*) e un ottimo modello per lo studio delle cellule staminali

Cellula staminale. Cellula che si duplica continuamente producendo sia cellule figlie identiche a se stessa che cellule che vanno incontro al differenziamento, anche con proprietà diverse tra loro. Ad esempio il cambio cribro-vascolare si divide: se la cellula derivata si trova verso l'esterno differenzierà in cellula floematica, se verso l'interno in cellula xilematica.

Proprietà delle cellule staminali.
Automantenimento. Cicli di divisione che generano a ripetizione almeno una cellula figlia equivalente alla cellula d'origine, con la capacità latente di poter differenziare.

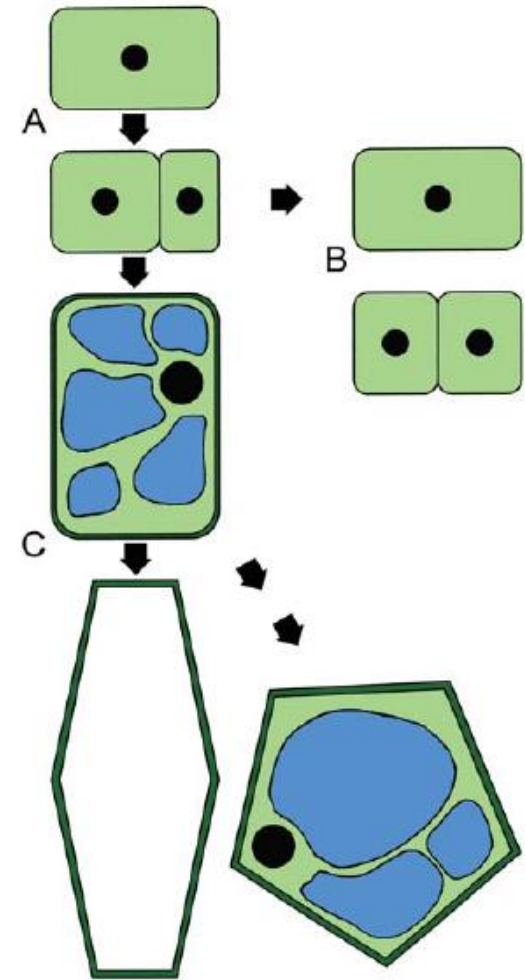


Figura 8.2

Da una cellula madre (A), per divisione mitotica, possono formarsi due cellule ineguali con un diverso destino: la più piccola (B) rimane meristemica e dopo l'accrescimento può ulteriormente dividersi, l'altra (C), più grande, dopo l'accrescimento per distensione e differenziamento, diventa una cellula adulta. Il differenziamento può portare alla morte della cellula che mantiene solo la parete, come avviene nelle cellule xilematiche e sclerenchimatiche, oppure, le cellule rimangono vive a maturità, come nel caso delle cellule parenchimatiche.

**Come avviene il
differenziamento cellulare?**

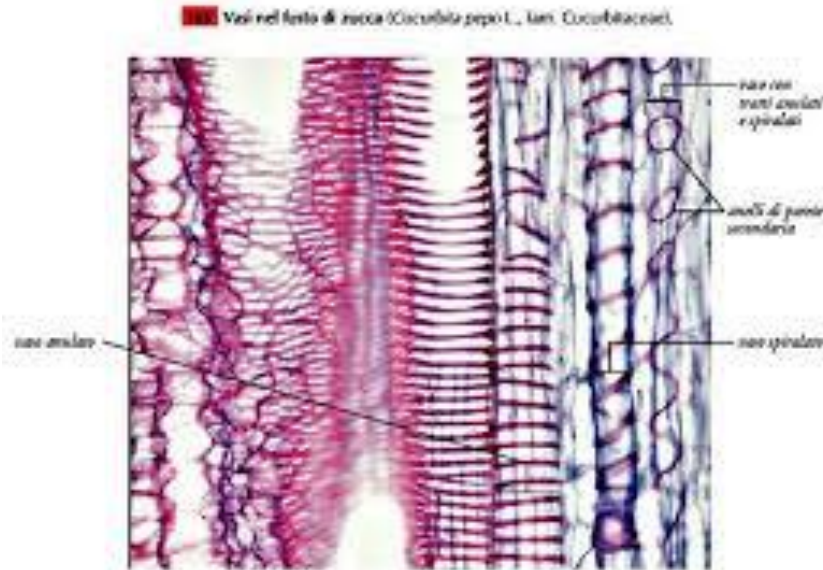
Il differenziamento della cellula inizia con uno stadio precoce di determinazione, a cui segue la crescita per distensione in cui il vacuolo si espande divenendo il compartimento cellulare più voluminoso.

Il differenziamento di norma prosegue anche dopo che la cellula ha raggiunto la sua forma definitiva sino a quando non abbia acquisito le caratteristiche specifiche per svolgere le sue funzioni peculiari.

L'accrescimento per distensione può portare la cellula ad aumentare il suo volume di centinaia, talvolta migliaia di volte. L'accrescimento, talora molto elevato, della cellula vegetale, è reso possibile dall'aumento in volume del sistema vacuolare, mentre l'aumento di volume del citoplasma è relativamente contenuto.

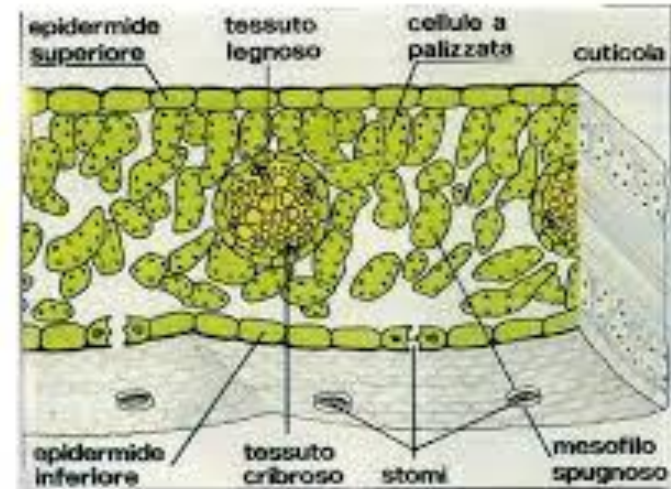
Il differenziamento cellulare induce cellule tutte identiche, come quelle embrionali, a formare tipi cellulari differenti, con caratteristiche citologiche e funzionali ben distinte.

Tessuto xilematico



L'accrescimento in una sola direzione è richiesto per il differenziamento di cellule vascolari

Tessuto spugnoso



L'accrescimento può non avvenire uniformemente in tutte le direzioni e questo comporta che le cellule si scollino e si distanzino in alcuni punti formando spazi intercellulari pieni di aria; questo fenomeno è fondamentale, ad esempio, nella formazione del parenchima spugnoso della foglia.

Il differenziamento cellulare è il risultato di programmi specifici di espressione genica (attivazione e/o repressione trascrizionale).

Come è operata la regolazione genica?

Differenti tipi cellulari sintetizzano diverse proteine perché essi trascrivono solo alcuni dei geni presenti nel loro genoma, mentre altri vengono trascritti in altri tipi cellulari.

Il differenziamento non dipende solo dall'espressione genica, ma è un processo più complesso che coinvolge interazioni tra le cellule, trasporto intercellulare di segnali, riorganizzazione delle pareti e talvolta anche interazione con fattori ambientali.

RIASSUMENDO

Lo sviluppo di un organismo pluricellulare coinvolge la divisione cellulare coordinata, la crescita ed il differenziamento per generare diversi tipi di cellule che contribuiscono alla formazione di tessuti organizzati, organi distinti ed infine al corpo della pianta.

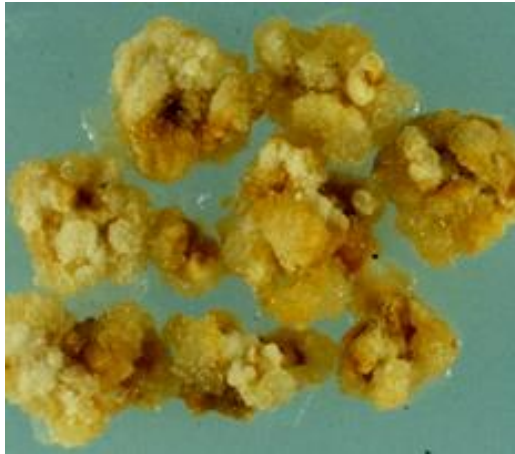
Totipotenza. Autosufficienza nel formare un organismo intero, caratteristica dello zigote e di una cellula somatica o meristemica nelle piante che dà luogo ad embriogenesi somatica. Non dimostrata in altri tipi cellulari dei vertebrati.

Pluripotenza. Abilità di una singola cellula staminale a dar luogo a molti ma non a tutti i tipi cellulari che formano un organismo. Nelle piante sono i meristemi apicali ed *in vitro* il callo nel dare luogo ad organogenesi vegetativa e radicale.

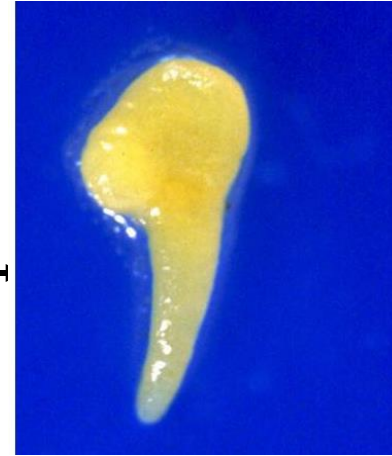
Multipotenza. Linee cellulari in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule. Esempio cellule staminali ematopoietiche presenti nel midollo osseo e che danno luogo a tutte le cellule del sangue. Nelle piante i meristemi secondari (cambio suberofellodermico e cambio cribro-vascolare)

Unipotenza capacità di generare solamente un tipo di cellula specializzata. Nelle piante cellule madri degli stomi, cellule dei peli radicali (effetto posizione). *In vitro* citodifferenziazione in cellule xilematiche

TOTIPOTENZA: Rigenerazione di pianta di peperone attraverso embriogenesi somatica indiretta



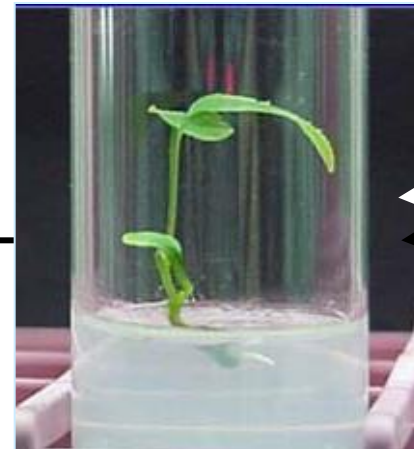
Callo



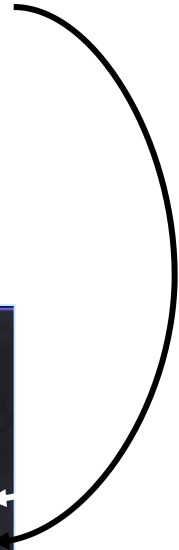
Embione somatico



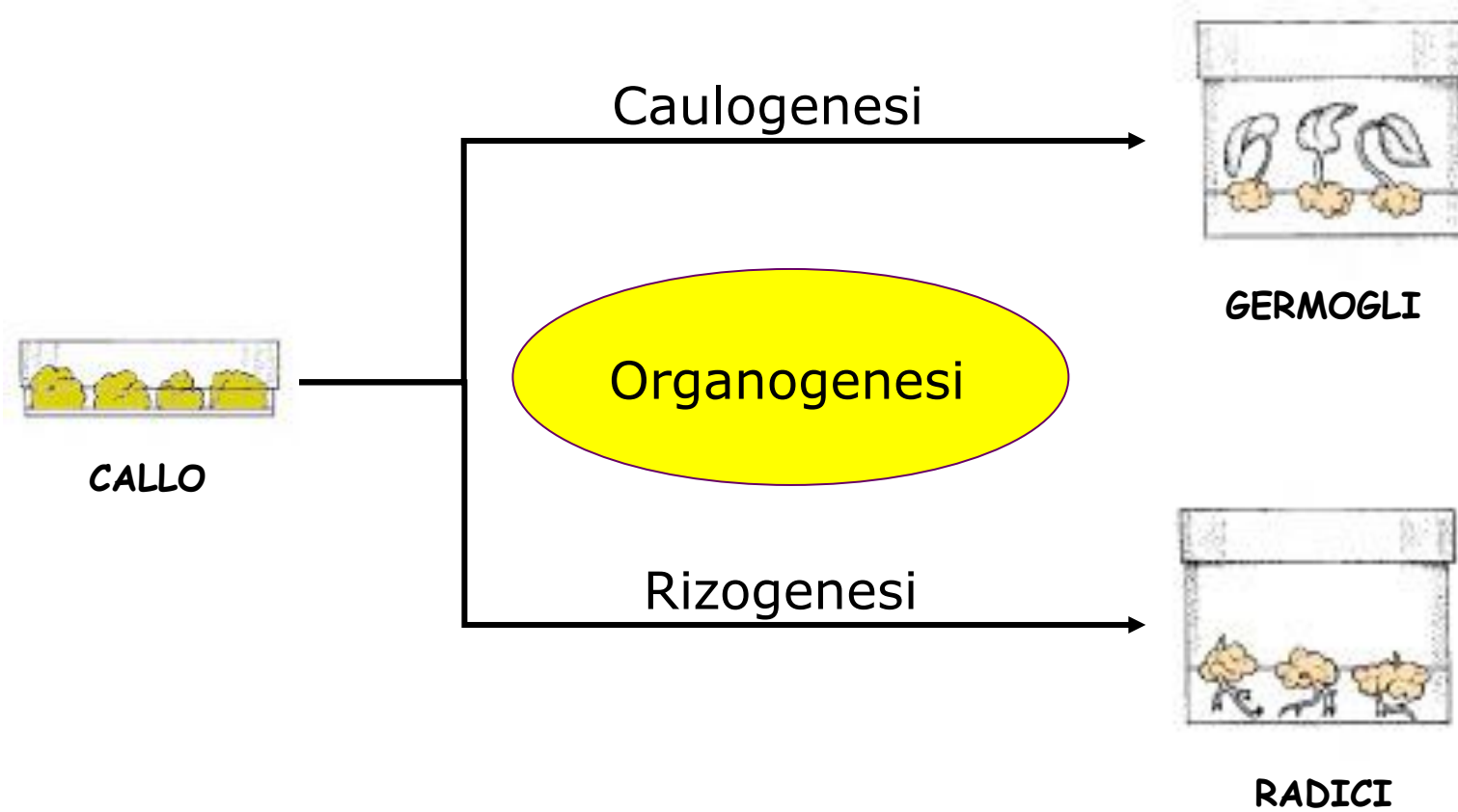
Pianta sviluppata



Plantula



PLURIPOTENZA



MULTIPOTENZA

Quando una cellula del cambio vascolare si divide, produce una nuova cellula dello xilema verso l'interno del fusto o della radice oppure una nuova cellula del floema verso l'esterno.



UNIPOTENZA

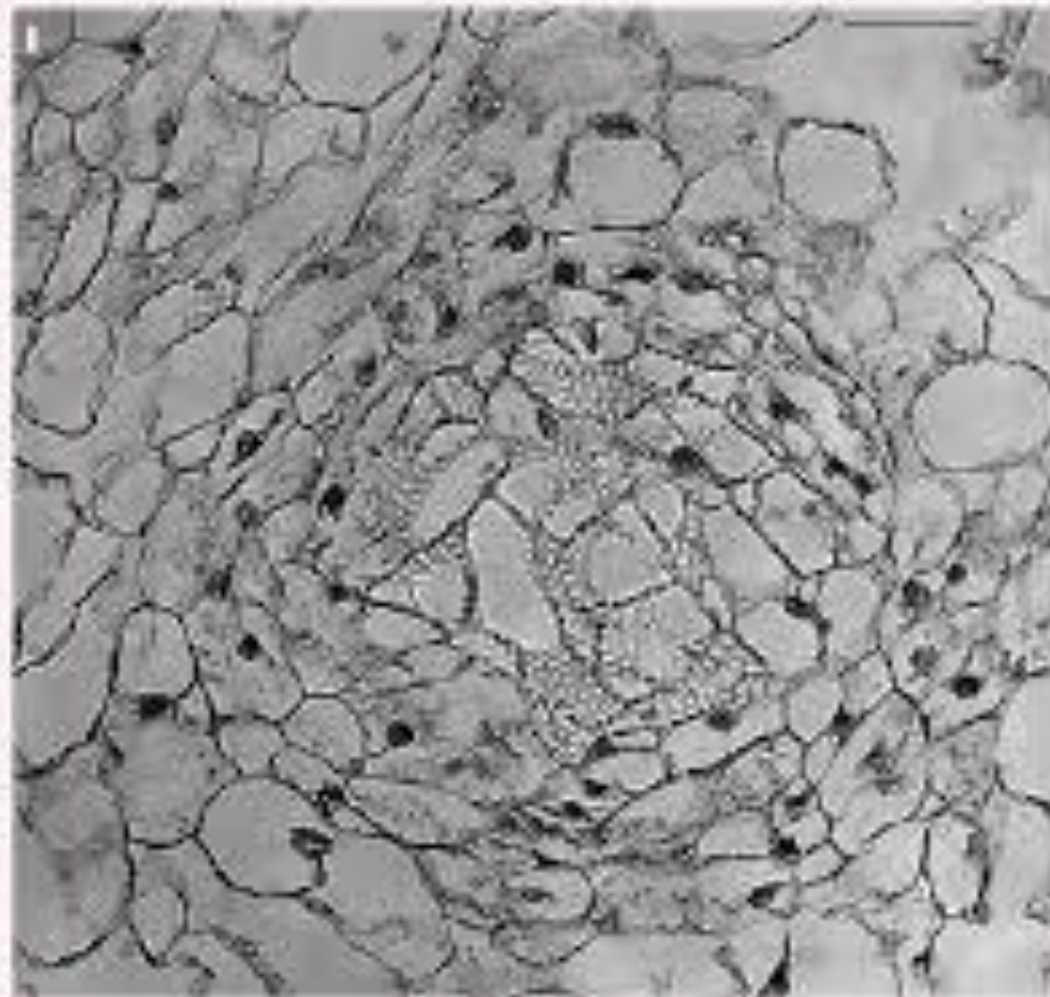


Fig. 01 → Particolare di callo di tabacco alogenico resistente un nodulo vascolare neoformato (foto L. Falantini, Università "La Sapienza", Roma).