

## Cellule staminali

Rispetto alle cellule staminali sappiamo ancora relativamente poco.

Le cellule staminali sono presenti sia negli embrioni che negli adulti. Le cellule staminali embrionali hanno la funzione di generare nuovi tessuti ed organi. Le cellule staminali negli adulti hanno il ruolo di rimpiazzare le cellule danneggiate e le cellule che hanno terminato il loro ciclo vitale.

Le cellule staminali embrionali si trovano negli embrioni nello stato di blastocisti. La rimozione di cellule staminali dall'embrione richiede la distruzione dell'embrione, il che è eticamente non possibile. Le cellule staminali embrionali vengono ricavate da feti abortiti.

Le cellule staminali adulte sono diverse e possiamo trovare *cellule staminali del cordone ombelicale*, *cellule staminali placentali* e *cellule staminali adulte*.

Una cellula uovo fecondata dà luogo allo zigote, che è la cellula che darà luogo ad un intero organismo. Le cellule che possono generare ogni altro tipo di cellula sono dette **totipotenti**. Le cellule totipotenti possono differenziarsi e dare luogo a tutti i tessuti embrionali e anche a quelli non embrionali, come la placenta.

L'embrione nella fase di blastocisti contiene le cellule della massa cellulare interna, che possono essere trasferite in un apposito terreno di coltura e coltivate per ottenere le cellule staminali embrionali. Le cellule staminali embrionali sono cellule **pluripotenti**, che possono dare origine a tutti i tessuti embrionali ma non alla placenta.

Le cellule staminali embrionali in apposito terreno di coltura possono essere mantenute nello stato indifferenziato. Cambiando terreno di coltura con uno che contiene specifiche molecole e fattori di differenziazione le cellule staminali embrionali si possono differenziare in quelle di tutti i tessuti dell'organismo, ad eccezione della placenta.

Le cellule staminali adulte sono **multipotenti**, cioè si possono differenziare in uno o pochi tipi cellulari. Ad esempio le cellule staminali emopoietiche possono dar luogo solo alle cellule del sangue. Le cellule staminali adulte possono essere mantenute in coltura indefinitamente, ma sono più difficili da isolare e coltivare.

Una cellula staminale è quindi una cellula non completamente differenziata, può dividersi in maniera illimitata e ad ogni divisione le cellule figlie possono scegliere se differenziarsi o rimanere cellula staminale.

Le cellule specializzate hanno una memoria del loro percorso di sviluppo, e non possono differenziare in un diverso tipo cellulare.

## Riprogrammazione

Le cellule possono essere riprogrammate inserendo il nucleo di una cellula differenziata in una cellula uovo non fecondata a cui è stato rimosso il nucleo. Con questo metodo un certo numero di cellule che hanno subito la sostituzione del nucleo riesce a dar luogo ad un organismo completo.

Se la cellula a cui è stato sostituito il nucleo viene trapiantato in utero, si può sviluppare un organismo clone, con il materiale genetico derivato da una cellula differenziata adulta. Questo dimostra che il genoma di una cellula adulta è completo ed in grado di riformare un organismo sano. Questo dimostra anche che nella cellula uovo ci sono dei fattori citoplasmatici in grado di riprogrammare un nucleo.

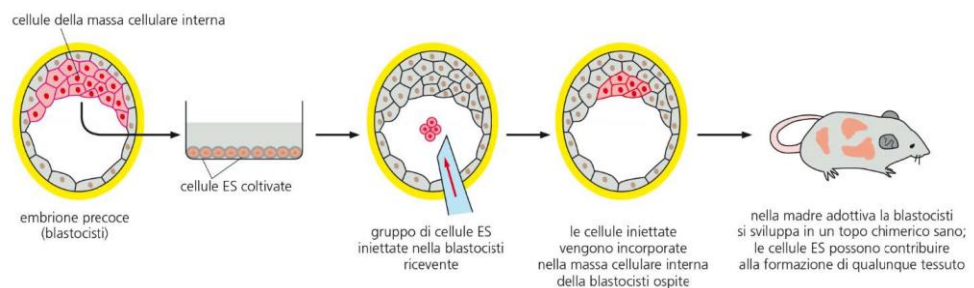
La riprogrammazione in questi esperimenti non era perfetta, infatti il successo della procedura di trasferimento del nucleo era molto bassa (meno dell'1%, dato dalla prof.).

La riprogrammazione di un nucleo trapiantato in una cellula uovo comporta importanti modifiche della cromatina. Si è visto che il nucleo aumenta di volume con la decondensazione della cromatina. Si ha anche un'alterazione globale del pattern di metilazione del DNA e degli istoni; alcuni tipi di istoni vengono sostituiti. I fattori citoplasmatici della cellula uovo sono quindi in grado di riprogrammare lo stato della cromatina, rendendo il genoma nuovamente in grado di dar luogo ad un organismo completo, con tutti i tipi cellulari.

## Cellule staminali embrionali, ES

Una cellula uovo fecondata oppure una cellula ottenuta per trapianto di nucleo possono dar luogo ad un intero individuo pluricellulare. La cellula staminale embrionale è una cellula pluripotente che può dar luogo a tutte le cellule dell'organismo, ma non ad un intero organismo, perché non possono dar luogo alla placenta.

Cellule staminali embrionali possono essere trapiantate in una blastocisti ricevente, esse vengono incorporate nella massa cellulare interna della blastocisti ospite. Nella madre adottiva la blastocisti darà luogo ad un organismo chimerico, formato in parte dalle cellule originali dell'embrione con il loro DNA, ed in parte dalle cellule trapiantate che avranno un materiale genetico diverso.



Le caratteristiche di pluripotenza e di evasione della senescenza delle cellule staminali embrionali sono dovute all'espressione di particolari enzimi e fattori. Le cellule staminali embrionali presentano un alto livello di attività delle telomerasi. Inoltre un numero relativamente piccolo di geni sono cruciali nelle caratteristiche di pluripotenza. Tra questi geni troviamo **Oct4**, **Sox2**, **Klf4** e **cMyc**, che sono fattori di trascrizione.

Cellule epatiche sono state convertite in neuroni facendo esprimere tre fattori di trascrizione del sistema nervoso. Questo causa l'attivazione trascrizionale di molti geni specifici del sistema nervoso e la repressione di geni specifici del tessuto epatico.

Grazie a questi esempi si è dimostrato che si possono convertire cellule differenziate in cellule pluripotenti forzando l'espressione di pochi specifici fattori di trascrizione.

Per il trattamento di molte malattie genetiche potrebbero essere usate le cellule staminali come terapia. Le cellule staminali embrionali non possono essere usate sia per problemi etici che per problemi legati al rischio di proliferazione incontrollata delle cellule staminali embrionali, che se non correttamente differenziate possono dar luogo a neoplasie, oltre a problemi di rigetto.

Per evitare questi problemi si è cercato di riprogrammare le cellule differenziate per ottenere cellule indifferenziate. Nel 2006 si è dimostrato che i fibroblasti possono essere riprogrammati per dar luogo a cellule staminali pluripotenti iPSC o iPS.

I ricercatori avevano in precedenza trasformato fibroblasti di topo con vettori virali contenenti 24 geni considerati cruciali per le cellule indifferenziate pluripotenti. Nessuno di questi 24 geni fu sufficiente da solo a determinare la riprogrammazione dei fibroblasti. Solo nel 2006 il gruppo di Yamanaka ha trasformato i fibroblasti con 4 regolatori della trascrizione, ottenendo la riprogrammazione di fibroblasti di topo in cellule pluripotenti simili a quelle staminali embrionali.

I 4 fattori identificati sono **Oct4**, **Sox2**, **Klf4**, **Myc** (OSKM). Questi fattori sono in grado di indurre la propria sintesi ed anche la sintesi reciproca, in un circuito a feedback che si autoalimenta, mantenendo le cellule in uno stato indifferenziato, anche quando tutti i fattori di trascrizione aggiunti dall'esterno vengono rimossi.

I fattori Oct4, Klf4 e Sox2 sono i principali, mentre Myc velocizza il processo di riprogrammazione, decondensando la cromatina. Una riprogrammazione stabile comporta anche l'espressione indotta permanente del gene *Nanog*.

Le caratteristiche delle iPS sono:

- queste cellule possono continuare a dividersi indefinitamente in coltura
- quando incorporate in una blastocisti partecipano alla formazione di un organismo completo
- in questo organismo contribuiscono a qualunque tipo cellulare

Le cellule iPS possono essere ottenute da cellule umane adulte. Esistono oggi metodi che non lasciano traccia di DNA estraneo nella cellula riprogrammata, usando vettori virali non integranti, oppure la trasformazione con plasmide (sole nelle cellule che si possono trasformare con un plasmide).

Si utilizzano varianti specifiche della miscela di regolatori della trascrizione, in base al citotipo che si vuole ottenere. Oct4 sembra avere un ruolo essenziale nel processo di riprogrammazione.

La conversione di cellule in iPS è poco efficiente, solo poche cellule che ricevono i fattori di trascrizione diventano iPS.

Le cellule con caratteristiche iPS devono essere selezionate dopo la riprogrammazione. Nel lavoro originale i fibroblasti utilizzati contenevano il gene di resistenza al G418, che è un antibiotico che blocca la sintesi proteica sia nei procarioti che negli eucarioti. Il gene codificante per la proteina che dà resistenza al G418 è

stato posto il controllo del promotore del gene Fbx15. Fbx15 è normalmente espresso solo nelle cellule staminali embrionali.

I ricercatori hanno poi introdotto i fattori di trascrizione OSKM; la maggior parte delle cellule non viene riprogrammata, le cellule riprogrammate saranno selezionate perché esprimeranno il gene Fbx15 e con lui il gene di resistenza al G418.

La riprogrammazione è un processo lento, che richiede 10 giorni o più dall'introduzione dei fattori di trascrizione prima che le cellule inizino ad esprimere i marcatori delle iPS.

Analizzando le cellule ad intervalli di tempo dopo l'introduzione dei fattori di trascrizione si sono distinte 2 ondate principali di neotrascrizione.

1. Inizialmente vengono indotti i geni per la proliferazione cellulare, del metabolismo e dell'organizzazione citoscheletrica. Si aveva la repressione dei geni associati allo sviluppo dei fibroblasti.
2. La seconda ondata di trascrizione vedeva l'induzione dei geni necessari allo sviluppo embrionale ed al mantenimento delle cellule staminali.

Alla fine del processo di riprogrammazione la cellula risultante non è più dipendente dai fattori di riprogrammazione aggiunti sperimentalmente.

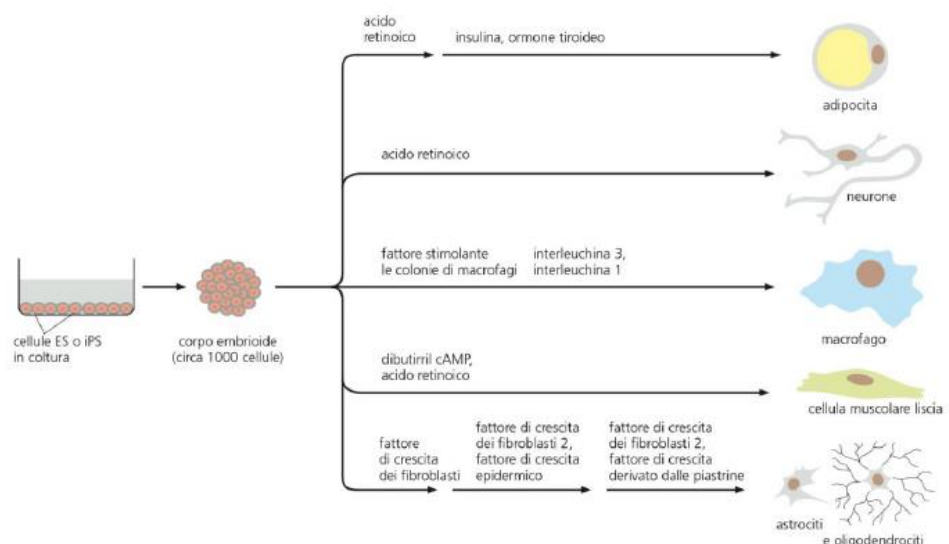
L'acetilazione degli istoni causa un allentamento della cromatina, quindi l'allentamento della cromatina è promosso da un aumento dell'enzima *istone acetil trasferasi* e dalla diminuzione dell'enzima *istone deacetilasi*.

Oggi si possono ricavare cellule con proprietà di pluripotenza da embrioni umani precoci, da cellule germinali fetali dell'uomo e da cellule differenziate di pazienti adulti iPS.

Le cellule staminali embrionali ES e le cellule iPS possono essere indotte a generare specifici tipi di cellule adulte. Queste

cellule possono essere coltivate su terreno di coltura, e quando separate danno luogo ad aggregati cellulari chiamati *corpi embrioidi*, nei quali le cellule iniziano a specializzarsi.

Le cellule ES ed iPS possono essere indotte alla differenziazione grazie ad una appropriata sequenza di stimoli, dati da proteine segnale, fattori di crescita e stimoli meccanici e funzionali.



## Transdifferenziazione diretta

Ci si è chiesti se fosse possibile evitare il passaggio intermedio ad iPS, riuscendo a convertire direttamente cellule differenziate e specializzate in altre cellule differenziate e specializzate appartenenti ad un altro citotipo. Si è dimostrato che questo è effettivamente possibile per molti tipi cellulari, anche se non sempre facile.

Un esempio di questa riprogrammazione diretta è stato fatto con *fibroblasti cardiaci* di topo, dove in seguito all'induzione di geni come Gata4, Mef2c e Tbx5 si è riusciti ad avere la riprogrammazione *in vivo* in *cardiomiociti*.

L'interesse per le cellule ES ed iPS e per la tecnologia del transdifferenziamento deriva dalla prospettiva di utilizzare cellule generate artificialmente per riparazione tissutale, modelli di patologie in vitro, sviluppo di nuovi farmaci diretti verso specifici citotipi (sempre modelli in vitro?).

Uno dei vantaggi dell'uso delle iPS è il superamento del rigetto immunitario, perché sono cellule che derivano dal paziente stesso a cui verranno poi somministrate.

## Utilizzo iPS

Le cellule del paziente possono essere riprogrammate in iPS. Le iPS possono essere indotte alla differenziazione verso il tipo cellulare malato, e le cellule differenziate così ottenute possono essere usate per lo studio dei meccanismi della malattia e per testare farmaci per la terapia, in cellule ricavate dal paziente stesso. Farmaci utili così identificati possono poi essere somministrati al paziente.

Le stesse cellule iPS ricavate dal paziente possono essere oggetto di gene targeting, nel caso in cui la patologia sia causata da una mutazione genetica. Usando il gene targeting su cellule iPS del paziente si ottengono cellule iPS che contengono una copia alternativa del gene di interesse, eventualmente riparata per rimuovere la mutazione causante la patologia. Cellule così ingegnerizzate possono essere nuovamente trapiantate nel paziente.

In questo modo si possono correggere difetti genetici, senza rischio di rigetto.

Un esempio è nella sindrome di Timothy. Questa patologia è causata da una mutazione in un canale per il  $\text{Ca}^{2+}$  ed è caratterizzata da alterazioni del battito cardiaco oltre a varie alterazioni multisistemiche.

Per studiare la patologia i ricercatori hanno prelevato fibroblasti dalla cute di pazienti con la patologia, ed hanno indotto le cellule a differenziare in cardiomiociti.

Le cellule così ottenute sono state confrontate con cardiomiociti ottenuti da soggetti sani in modo analogo.

Si è così evidenziata nei cardiomiociti dei pazienti malati una contrazione irregolare, alterazione dei flussi di  $\text{Ca}^{2+}$  ed anomalie nell'attività elettrica.

Campi in cui le cellule staminali potrebbero essere molto utili sono nella rigenerazione di midollo osseo in pazienti affetti da leucemia e linfoma, e nella riparazione di ustioni in pazienti ustionati.