



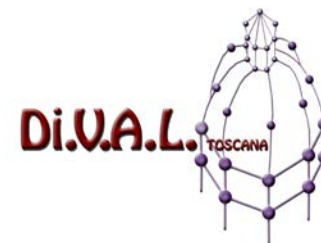
Dalla ricerca sulle staminali al lavoro sulle staminali: perché vale la pena provarci

*Prof.ssa Annarosa Arcangeli
Dipartimento di Medicina
Sperimentale e Clinica (UniFI)*



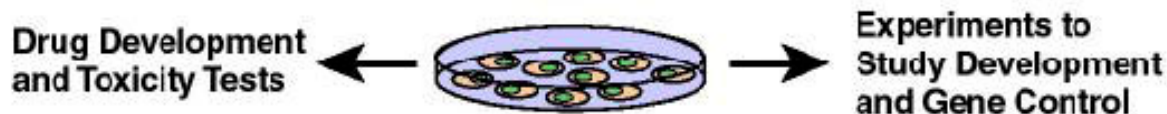
Firenze, 14 marzo 2014

Il lungo e affascinante viaggio della ricerca
sulle cellule staminali



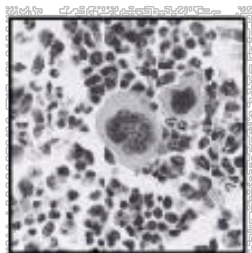
Perché studiare le cellule staminali?

The Promise of Stem Cell Research

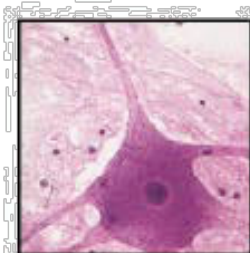


Cultured Pluripotent
Stem Cells

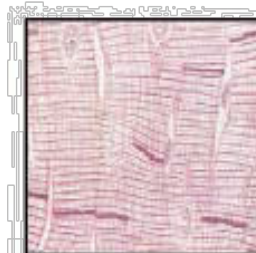
Tissues/Cells for Therapy



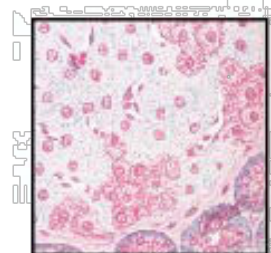
Bone Marrow



Nerve Cells



Heart Muscle
Cells



Pancreatic
Islet Cells



Quando si può parlare di cellula staminale? Come si valuta la staminalità di una cellula/popolazione cellulare?

- **In vitro:**

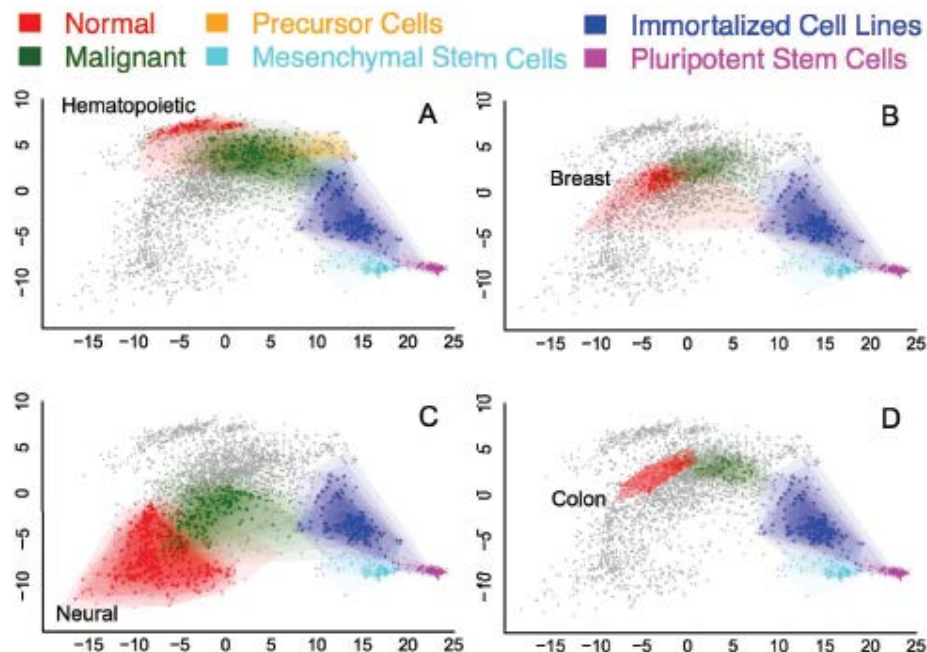
- Marcatori (es. Citofluorimetria; Profilo della espressione genica)
- Prove di differenziazione in vitro

- **In vivo:**

- “Ricostruzione” di un animale intero (Cellule staminali embionarie)
- “Ricostruzione” del tessuto/organo precedentemente “distrutto” (Cellule staminali adulte)

Analisi citofluorimetrica

Con l'impiego di un citofluorimetro è possibile analizzare i vari markers di superficie di una linea cellulare, discriminando così le cellule staminali dalle non staminali.



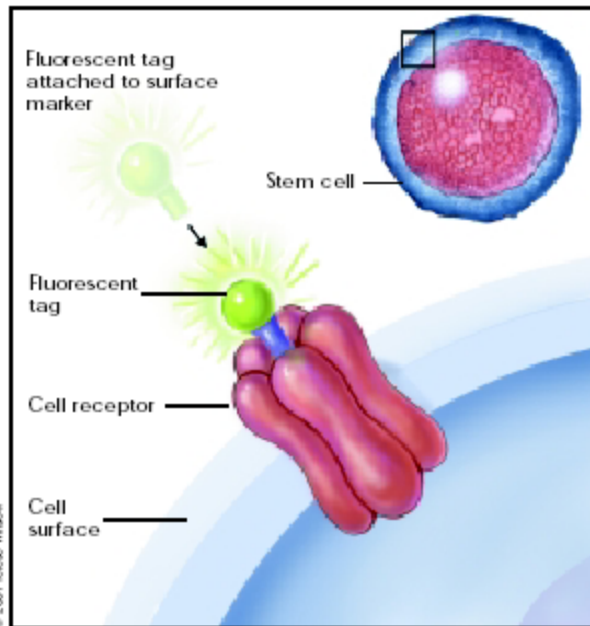


Figure E.1.1. Identifying Cell Surface Markers Using Fluorescent Tags.

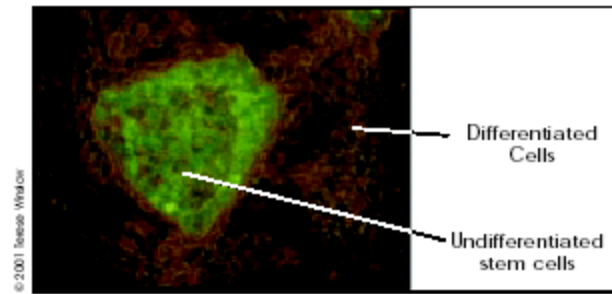
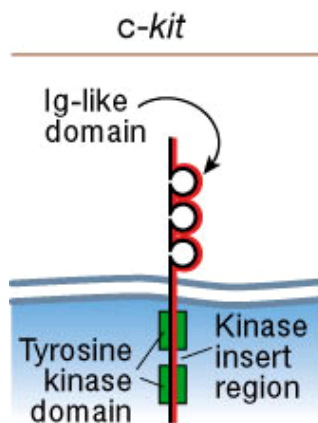


Figure E.1.3. Microscopic Image of Fluorescent-Labeled Stem Cell.

Marcatori di cellule staminali

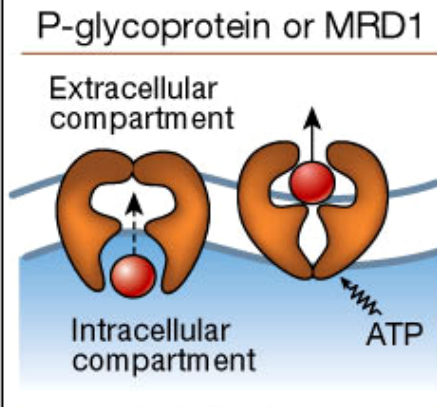


Distribution

- Melanocytes
- Mast cells
- Germ cells
- Stem cells

Functions

- Proliferation
- Migration
- Differentiation
- Secretion

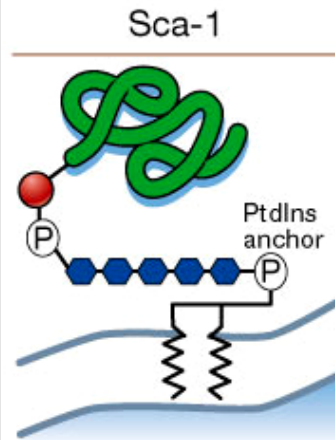


Distribution

- Hepatocytes–cholangiocytes
- Brush border cells
- Renal tubular cells
- Endothelial cells (brain)
- Cancer cells
- Stem cells

Functions

- Transmembrane efflux pump
- Inhibition of apoptosis



Distribution

- Vessel wall
- Kidney cortical tubules
- Thymus, spleen
- T lymphocytes
- Stem cells

Functions

- Cell adhesion
- Cell signalling
- T-cell activation

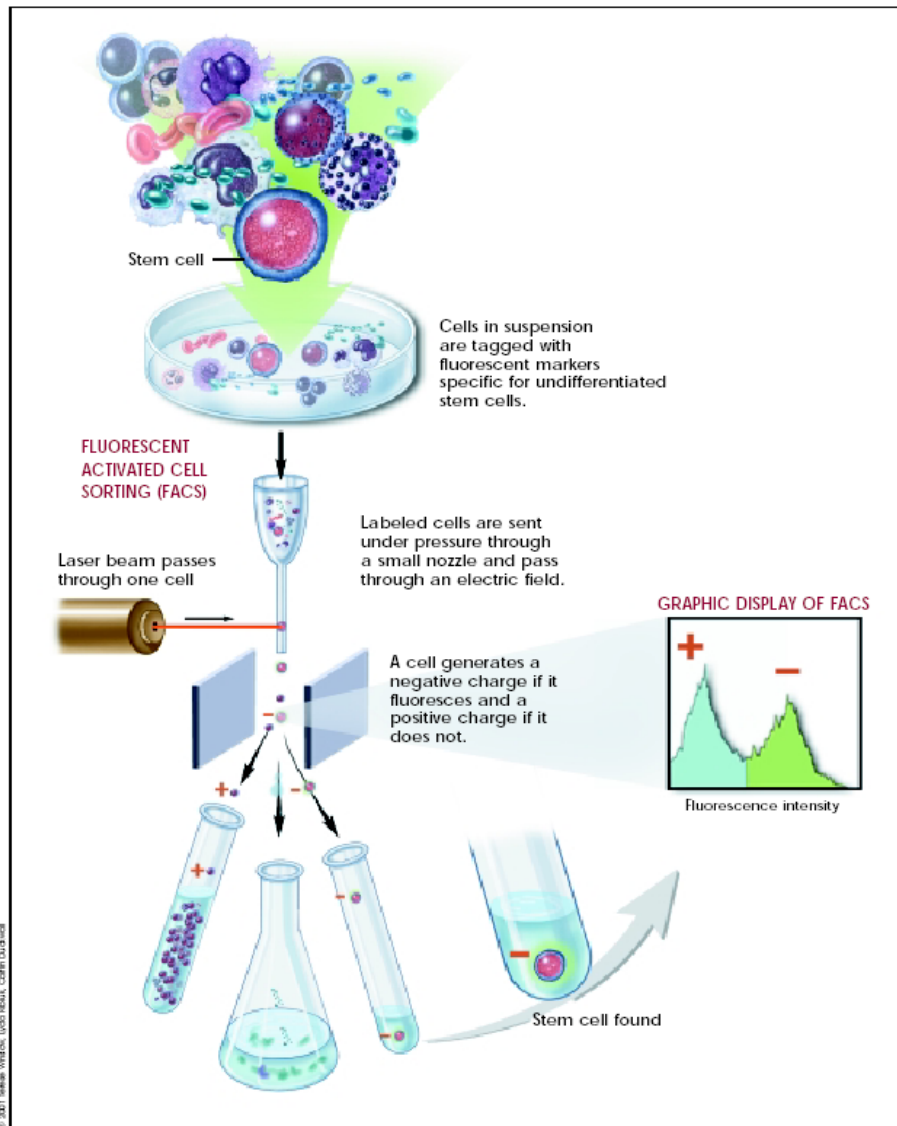


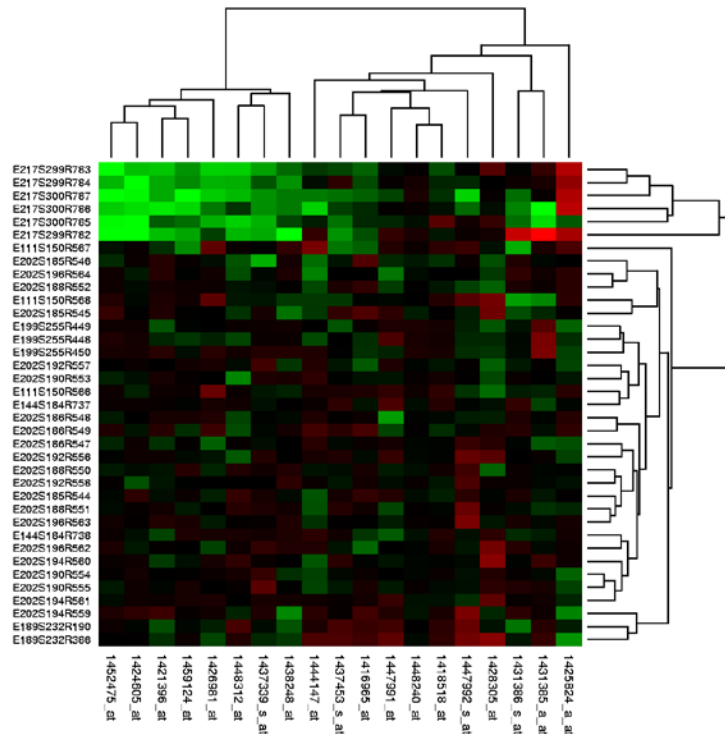
Figure E.1.2. Looking for a Needle in a Haystack: How Researchers Find Stem Cells.



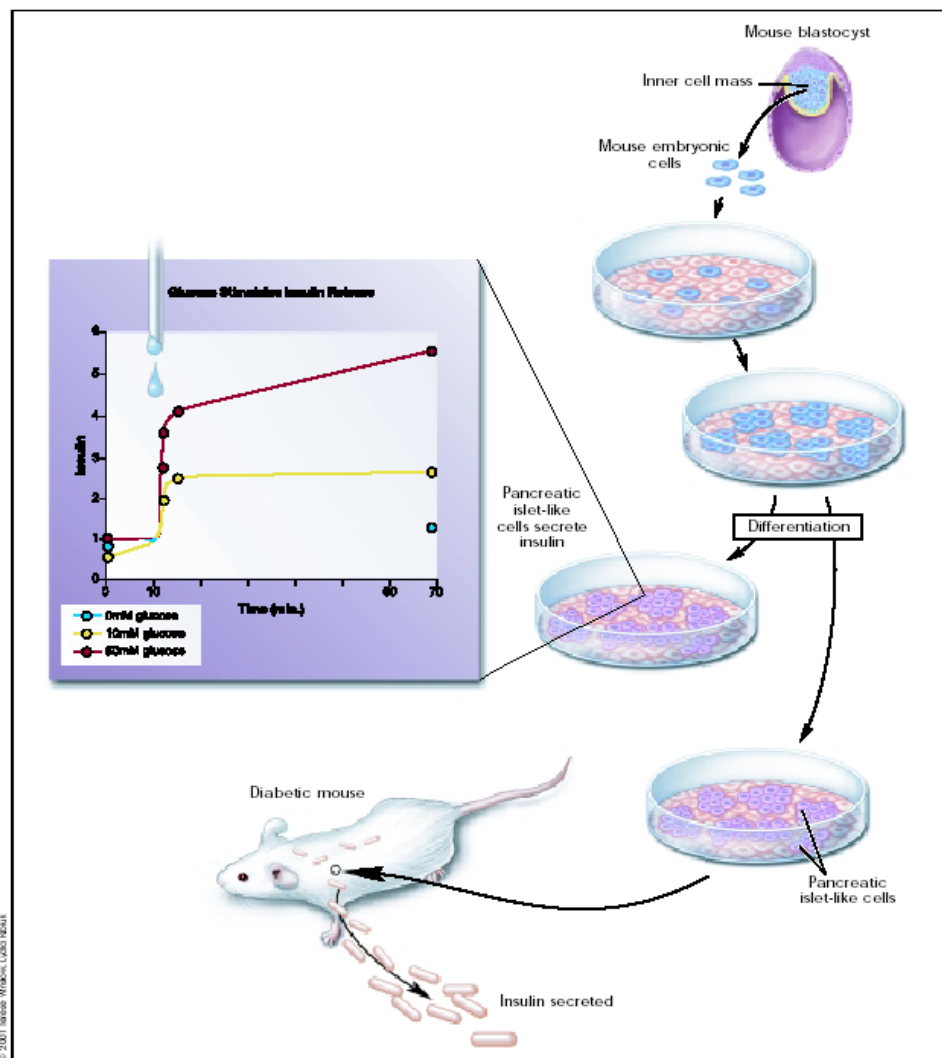
Gene Expression Profiling

Mediante GE microarray, è possibile analizzare l'espressione genica di un dato tipo cellulare.

Il test permette di confrontare i profili di espressione genica di campioni diversi identificando quali geni sono up-regolati e quali down-regolati al momento dell'analisi.



Prove di differenziamento in vitro



© 2001 Elsevier, Lucio DiLuzio

Figure 7.2. Development of Insulin-Secreting Pancreatic-Like Cells From Mouse Embryonic Stem Cells.

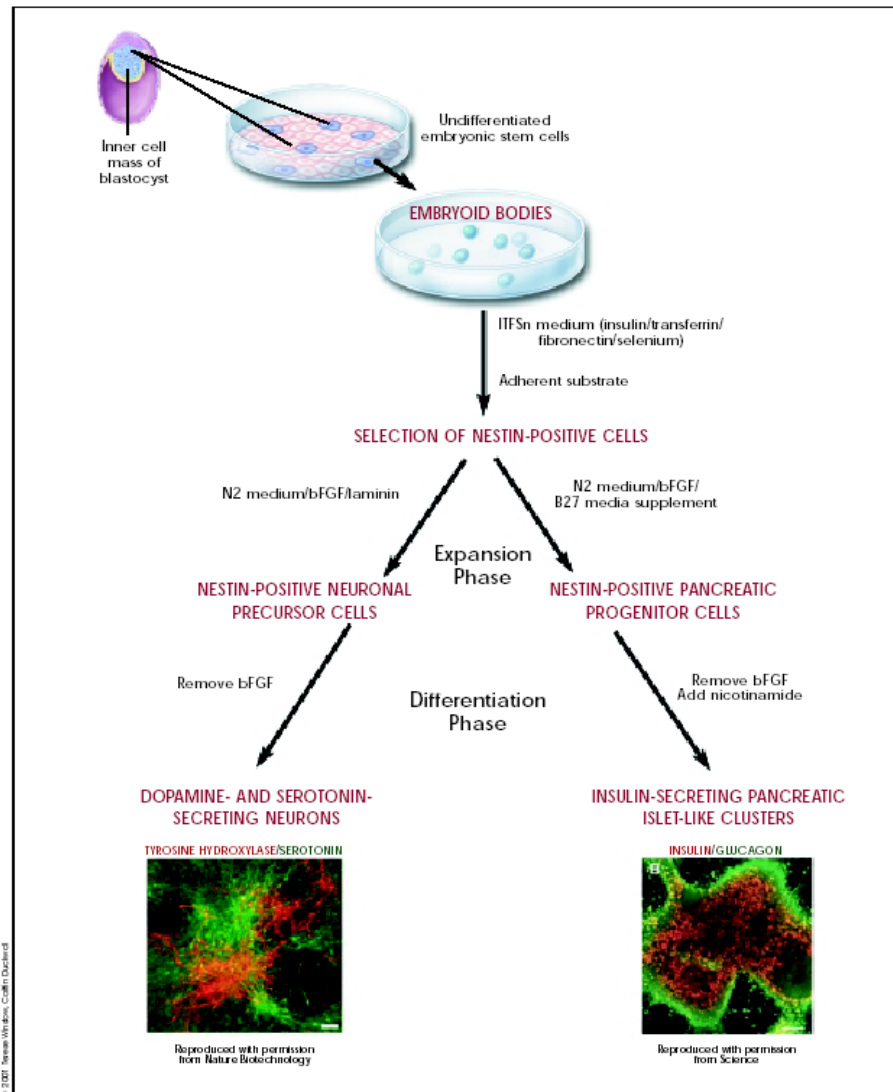


Figure B.3. Directed Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Into Neurons or Pancreatic Islet-Like Clusters.



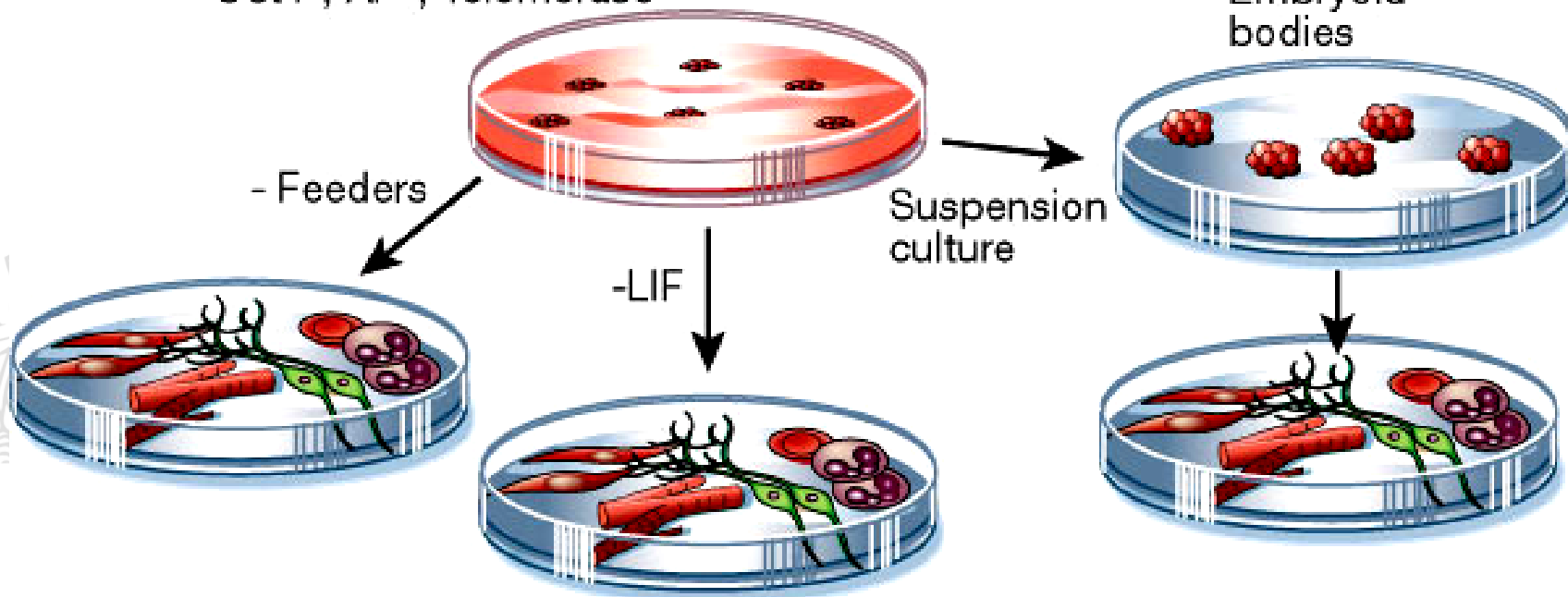
Coltura di cellule staminali embrionarie

Properties:

- in vitro culture for very long time periods
- unlimited amount of cells
- no signs of aging or senescence

EC/ES/EG cells
Oct4+, AP+, Telomerase+

LIF (leukaemia inhibitory factor)
Mantiene le ES in uno stato **indifferenziato** Le ES differenziano spontaneamente se si lasciano aggregare in corpi embrionali in assenza di LIF



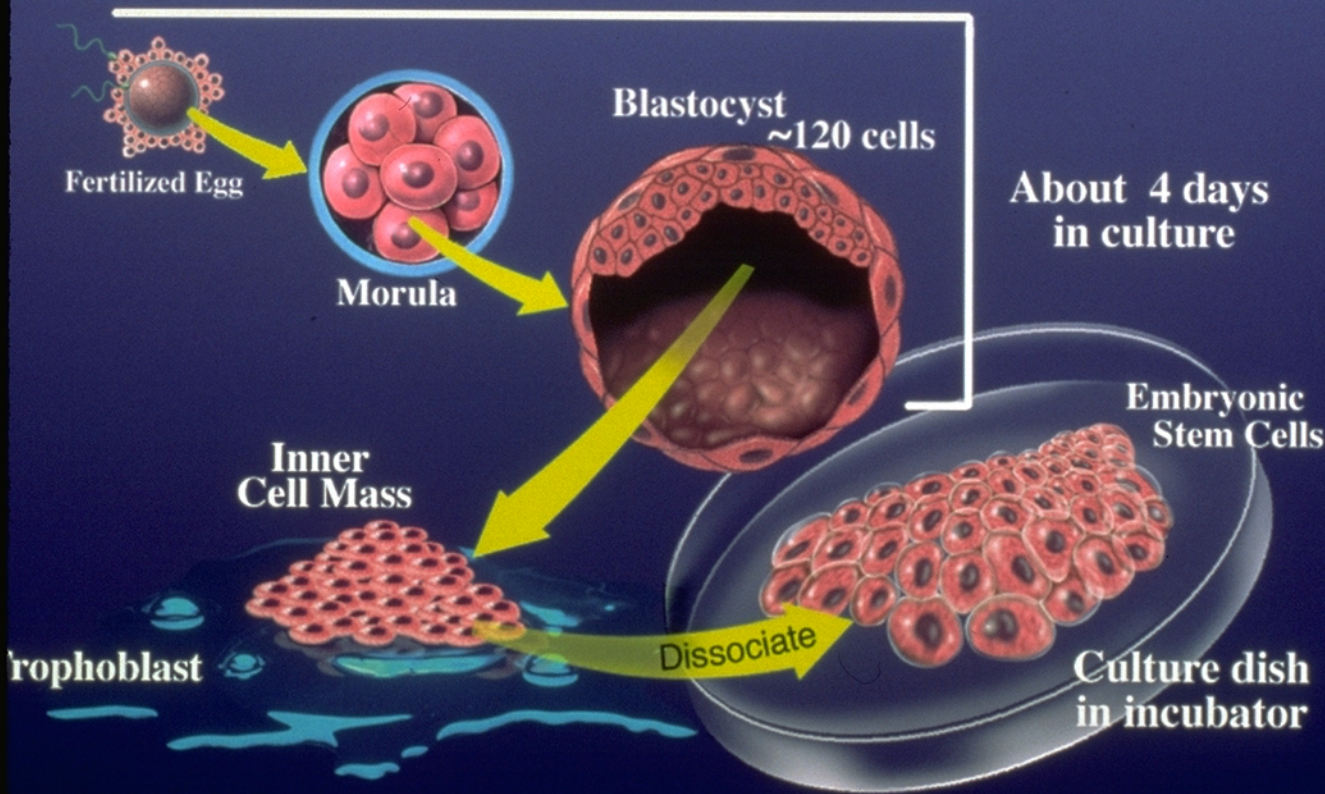


....e in vivo?????

“Ricostruzione” di un animale intero



Blastocysts Contain Pluripotential Stem Cells



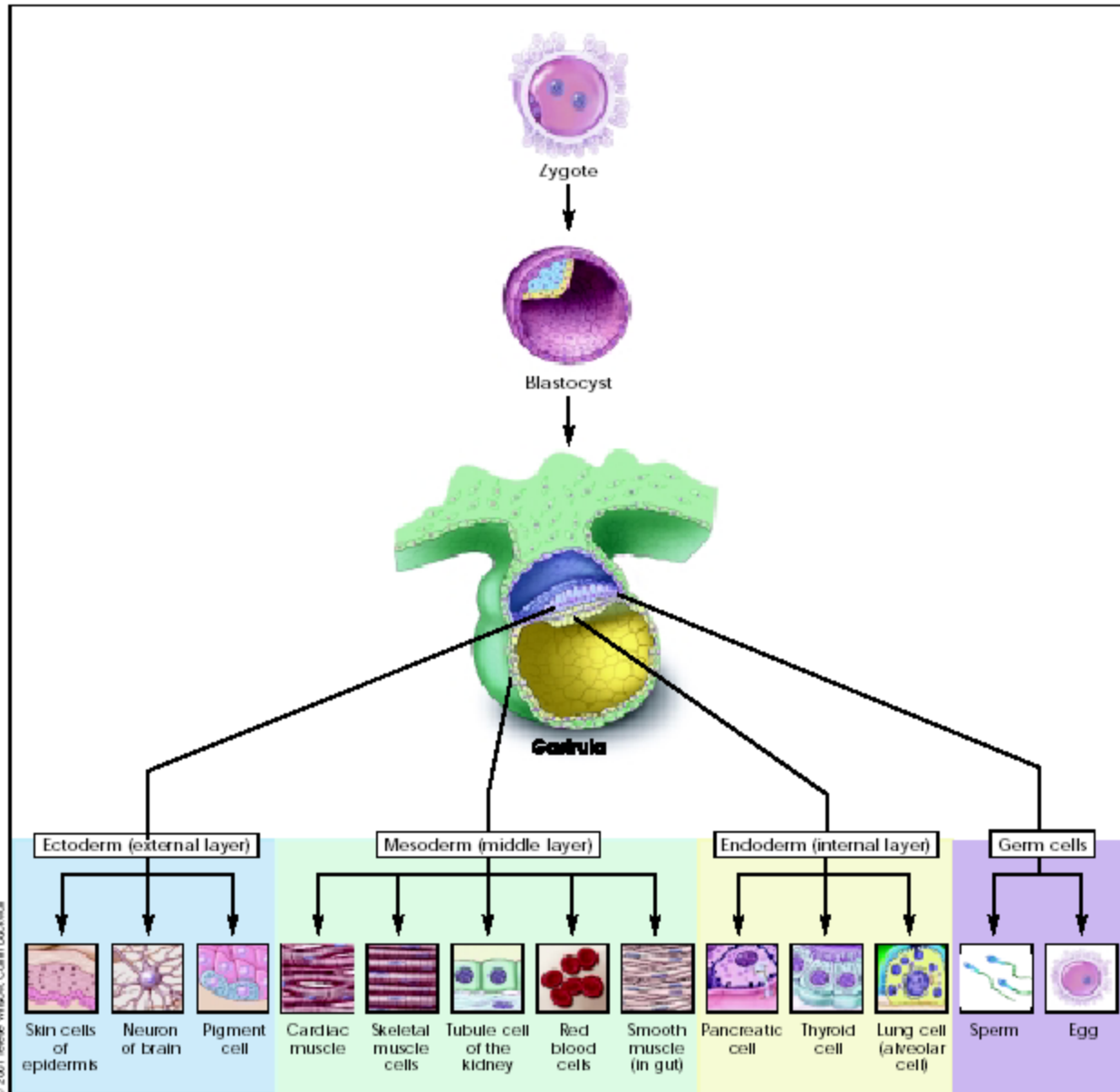
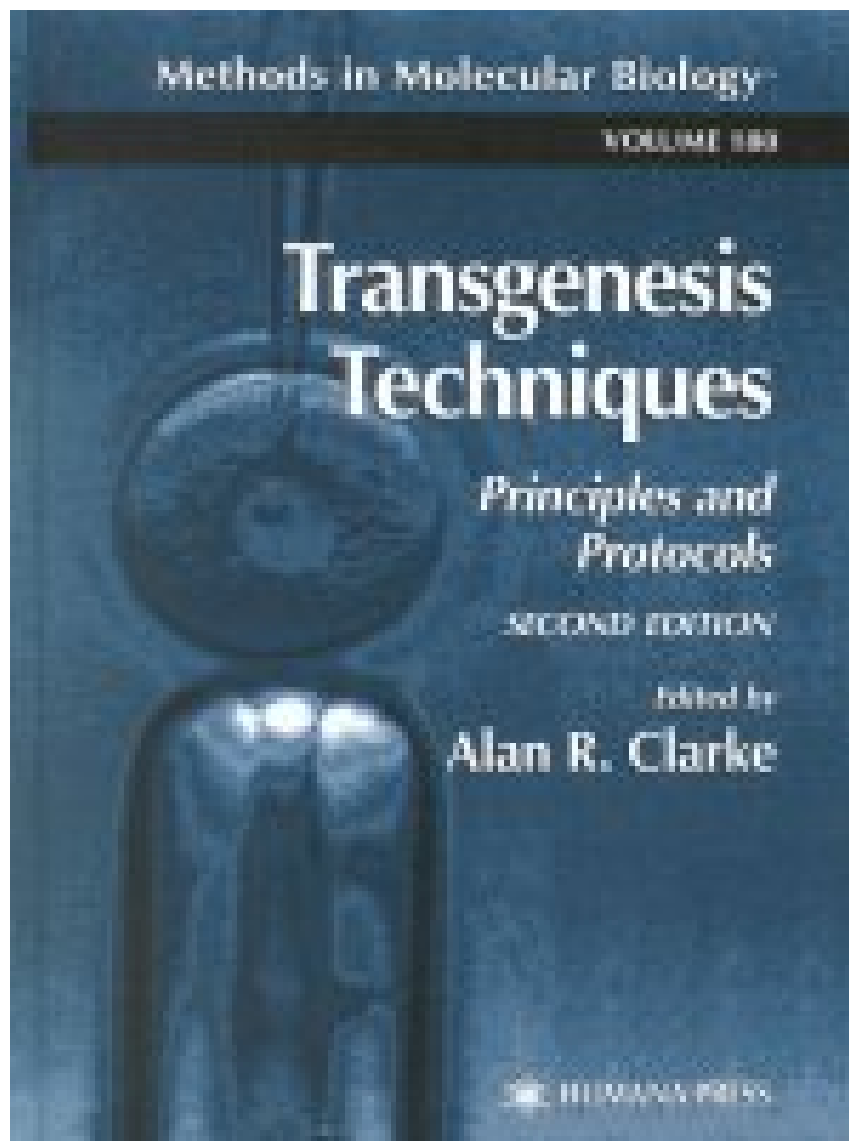


Figure 1.1. Differentiation of Human Tissues.



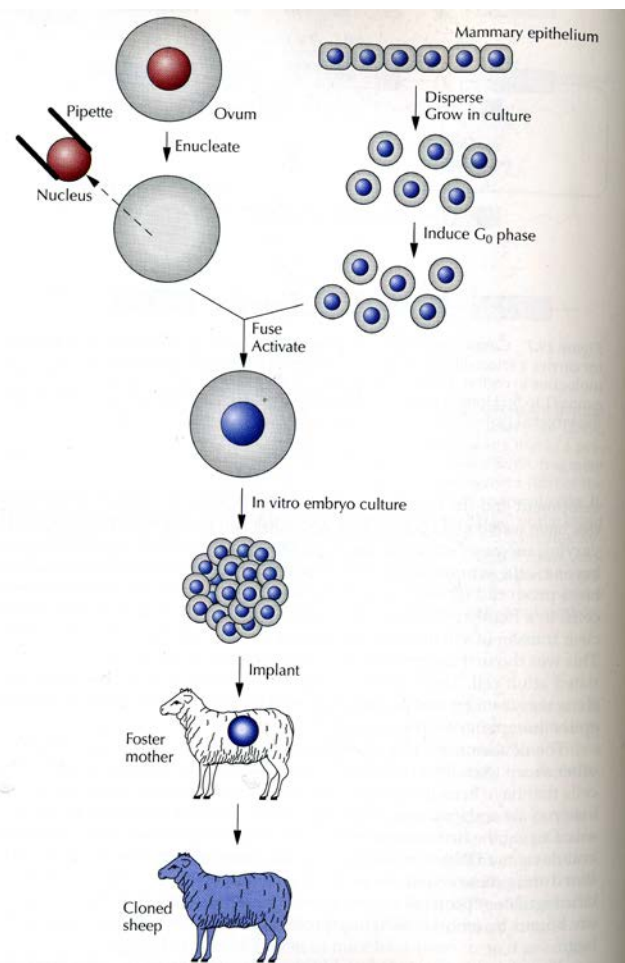
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE



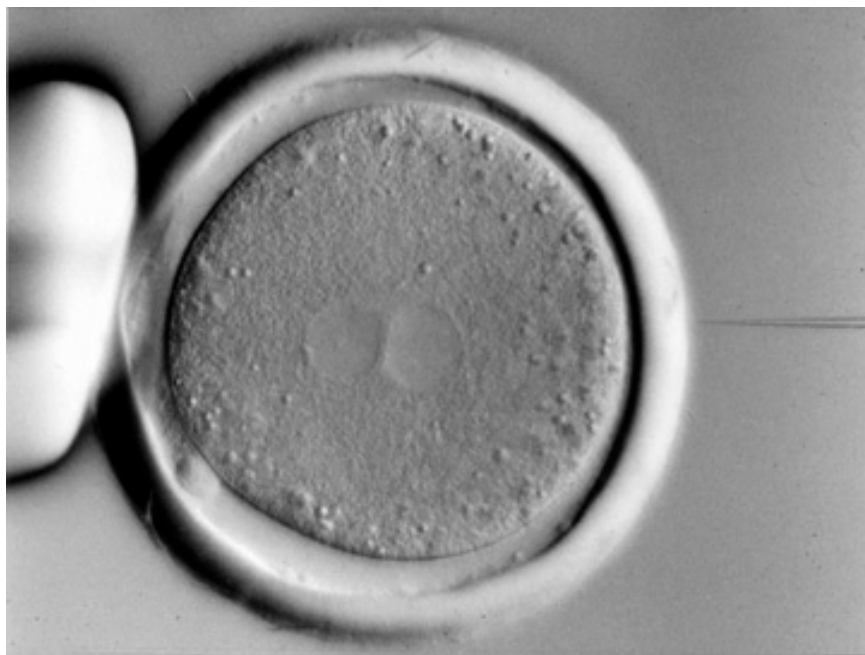
La pecora Dolly



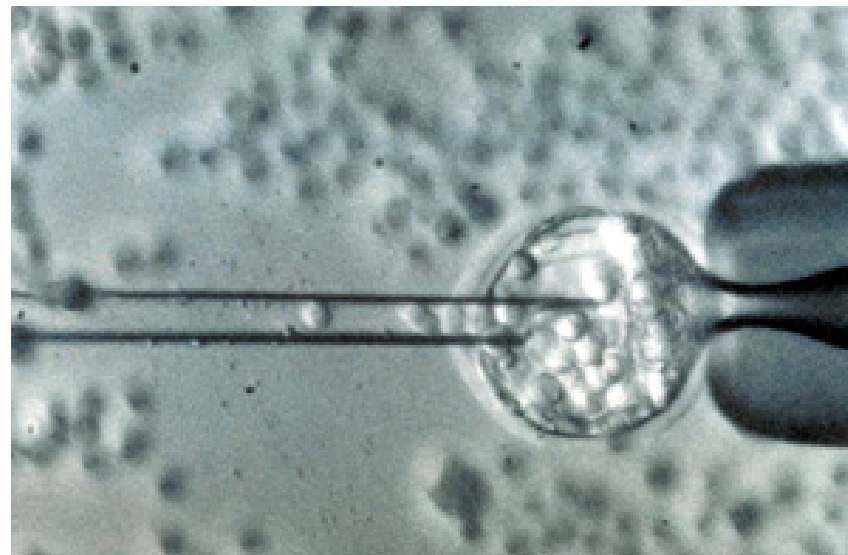
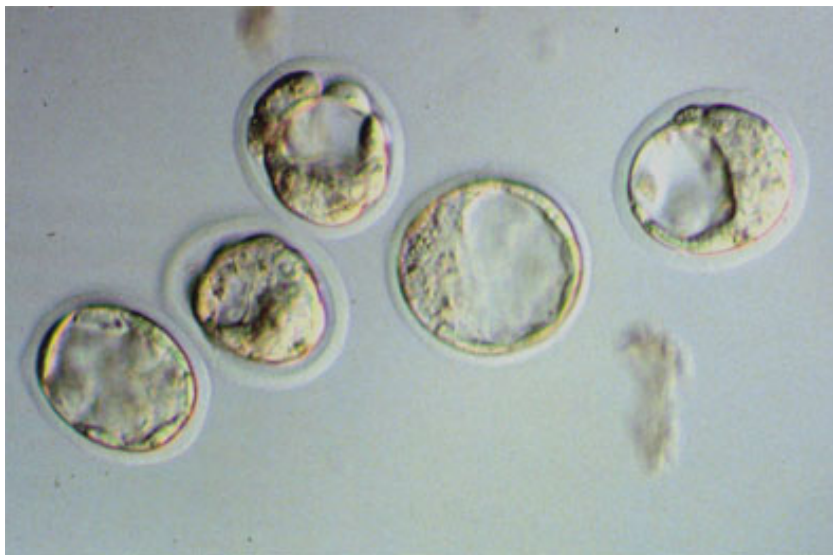
(AP PHOTO)



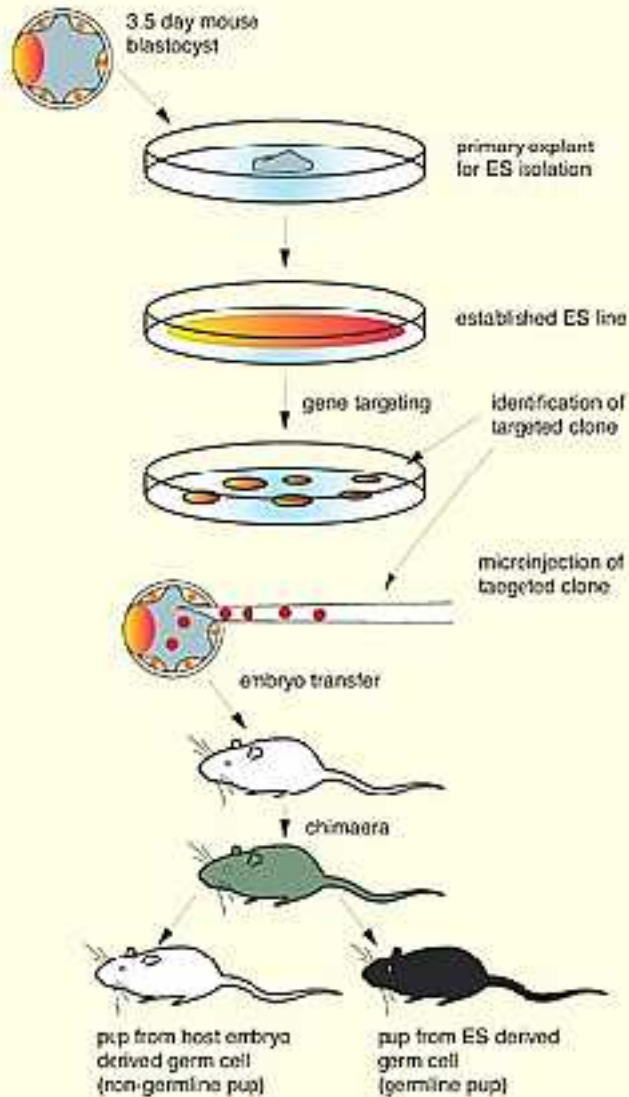
Microiniezione in oocita



La microiniezione in blastocisti



Generazione delle chimere

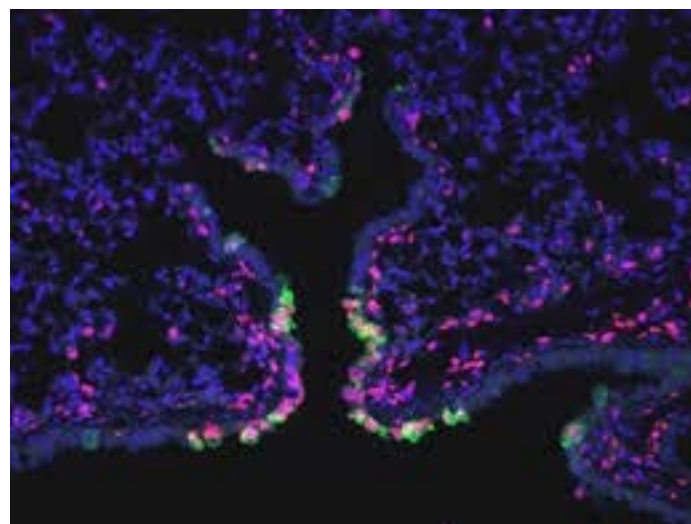
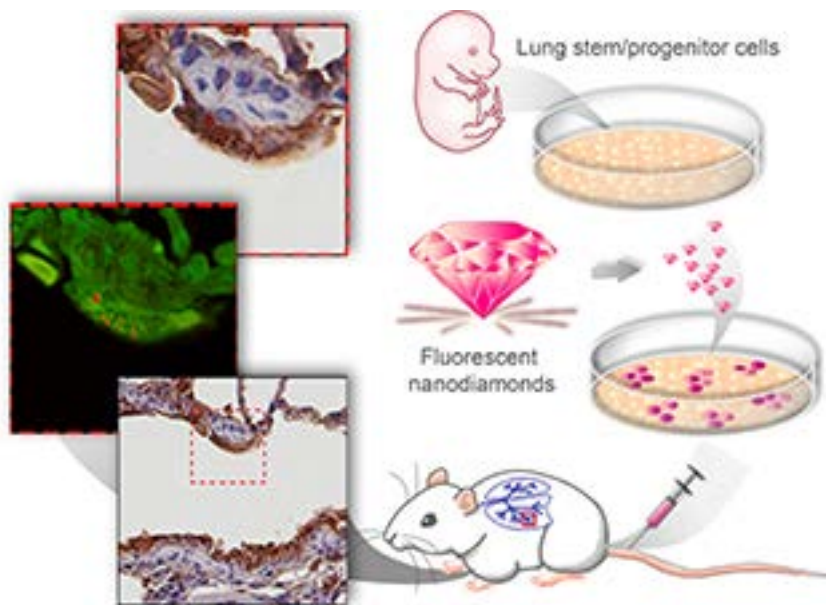




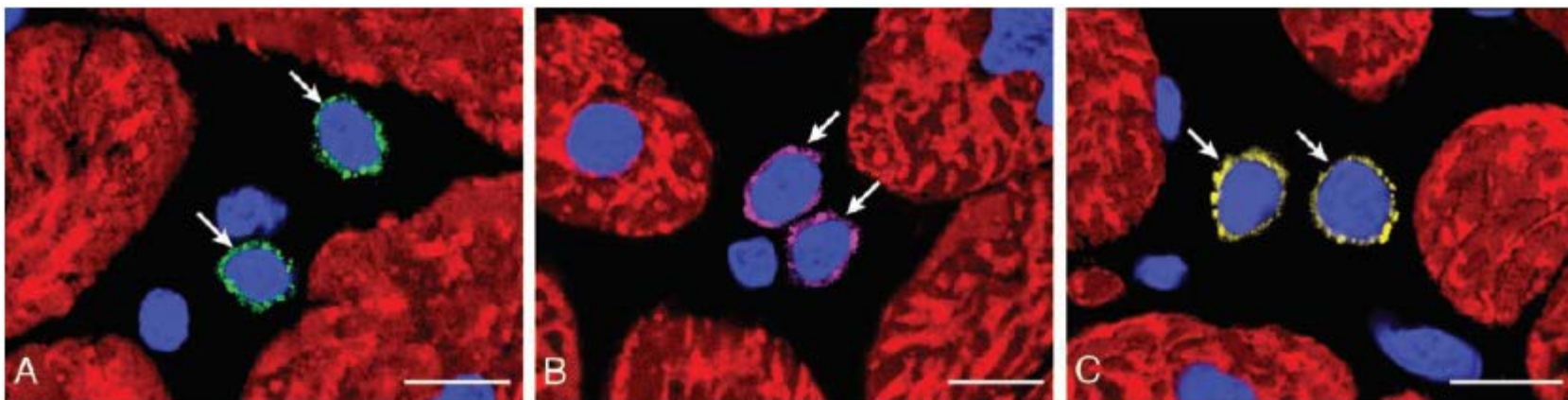
...e in vivo???

“Ricostruzione” di un tessuto/organo
danneggiato





Cellule staminali nel miocardio adulto



c-kit+

MDR+

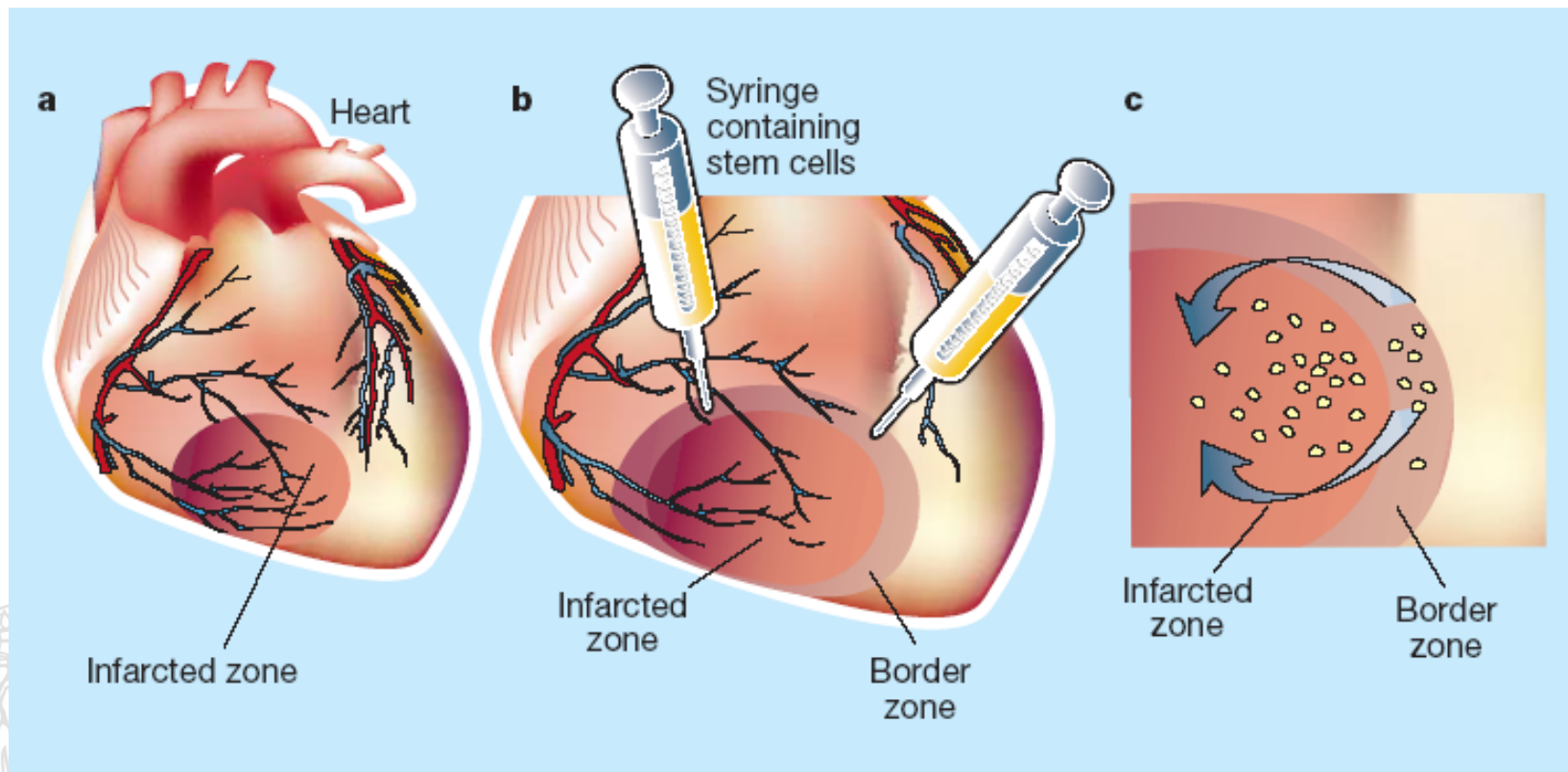
Sca1+

In seguito a danno d'organo proliferano (K67+, 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

Cellule mesenchimali staminali (MSC)

riparano il cuore infartuato



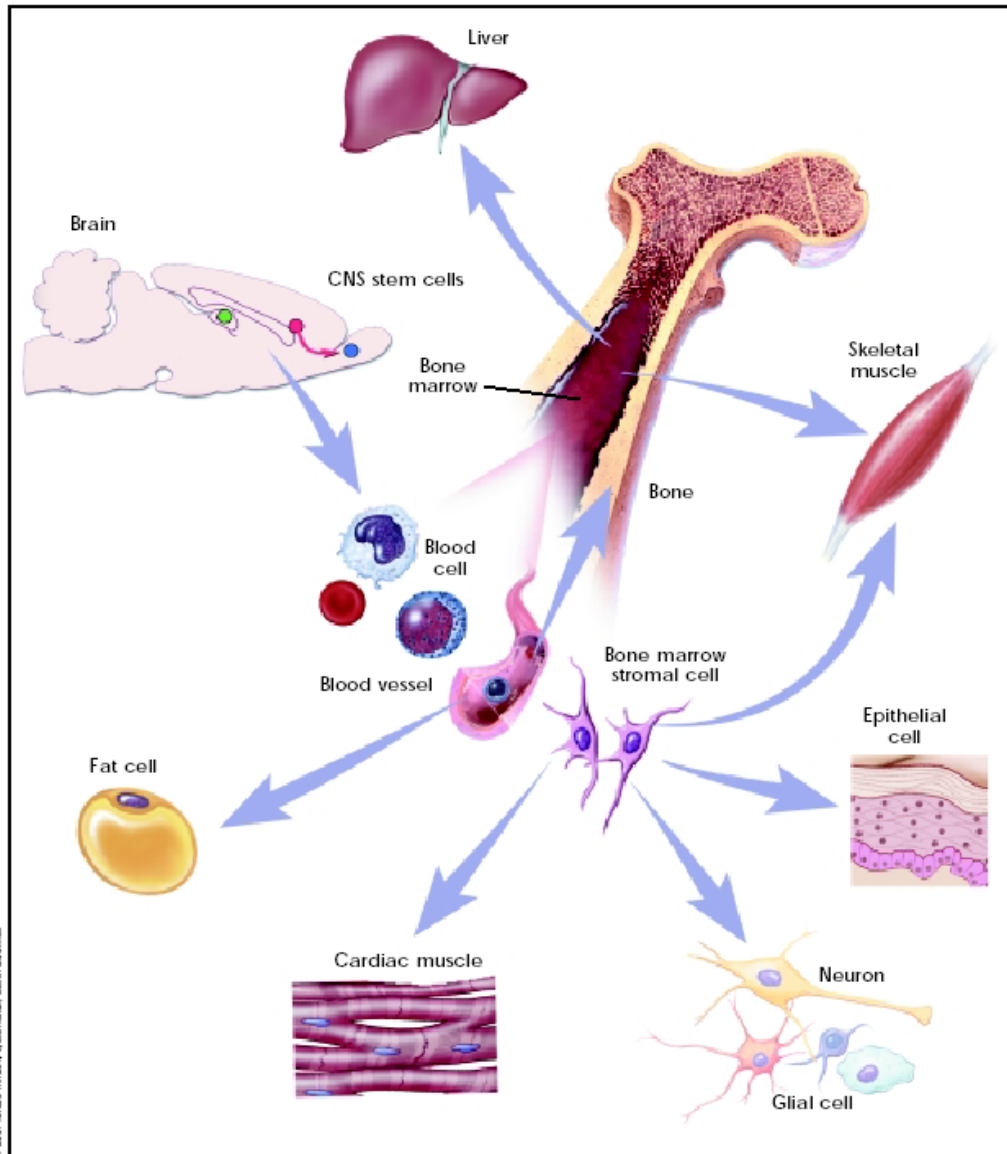
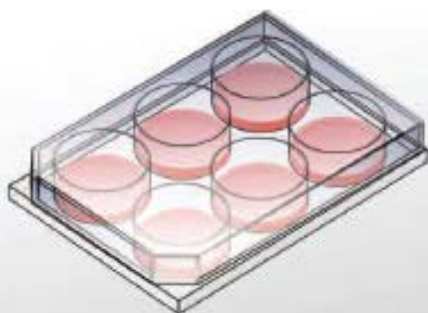


Figure 4.2. Preliminary Evidence of Plasticity Among Nonhuman Adult Stem Cells.

© 2001 Terese Winsky-Sommerer, Corbin Duchesne



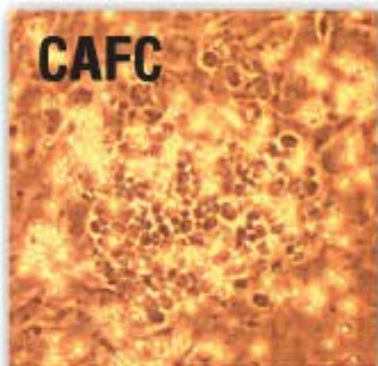
in vitro assays



HSC



in vivo assays



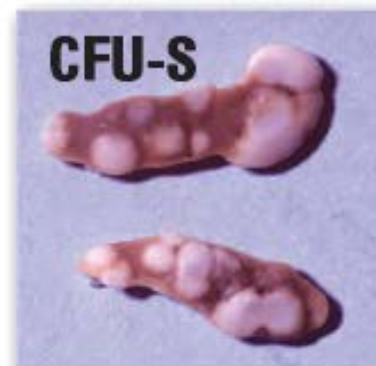
CAFC

growth as "cobblestones"
for 5 to 7 weeks



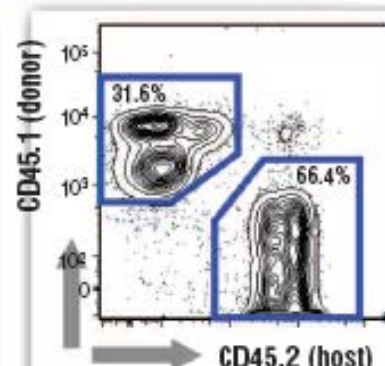
LTC-IC

Maintenance of progenitors
for 5 to 7 weeks



CFU-S

Short-term assays (CFU-S)



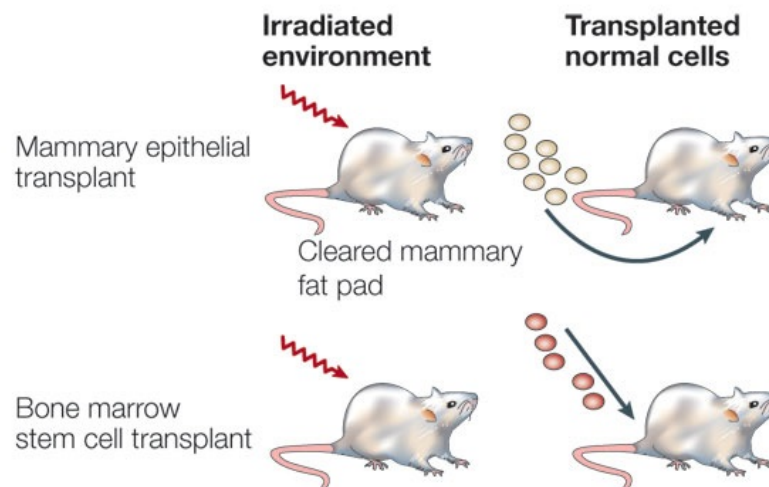
Long-term reconstitution

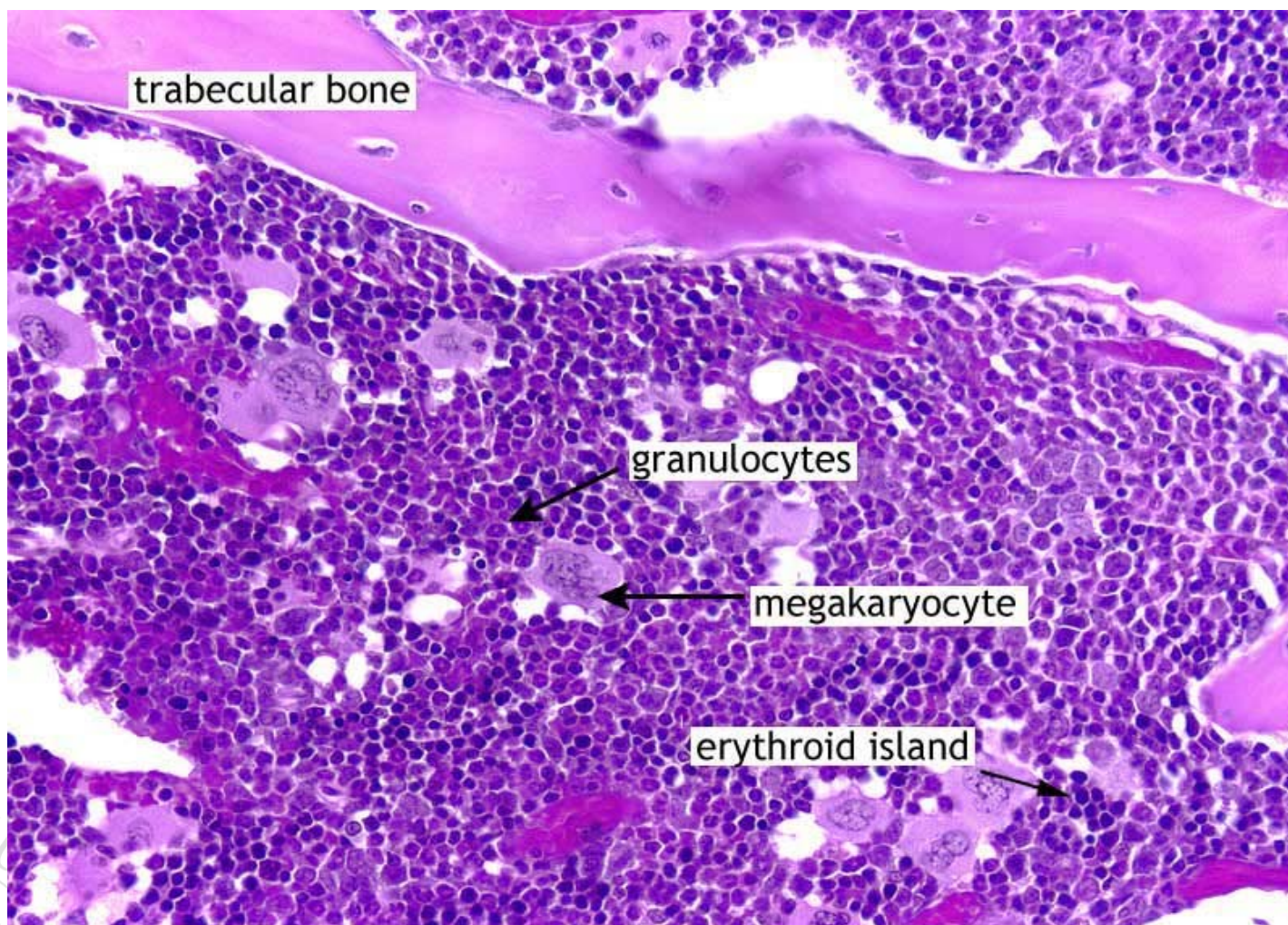
Trapianto di staminali ematopoietiche

Irradiando un topo si induce la totale ablazione della popolazione ematopoietica midollare.

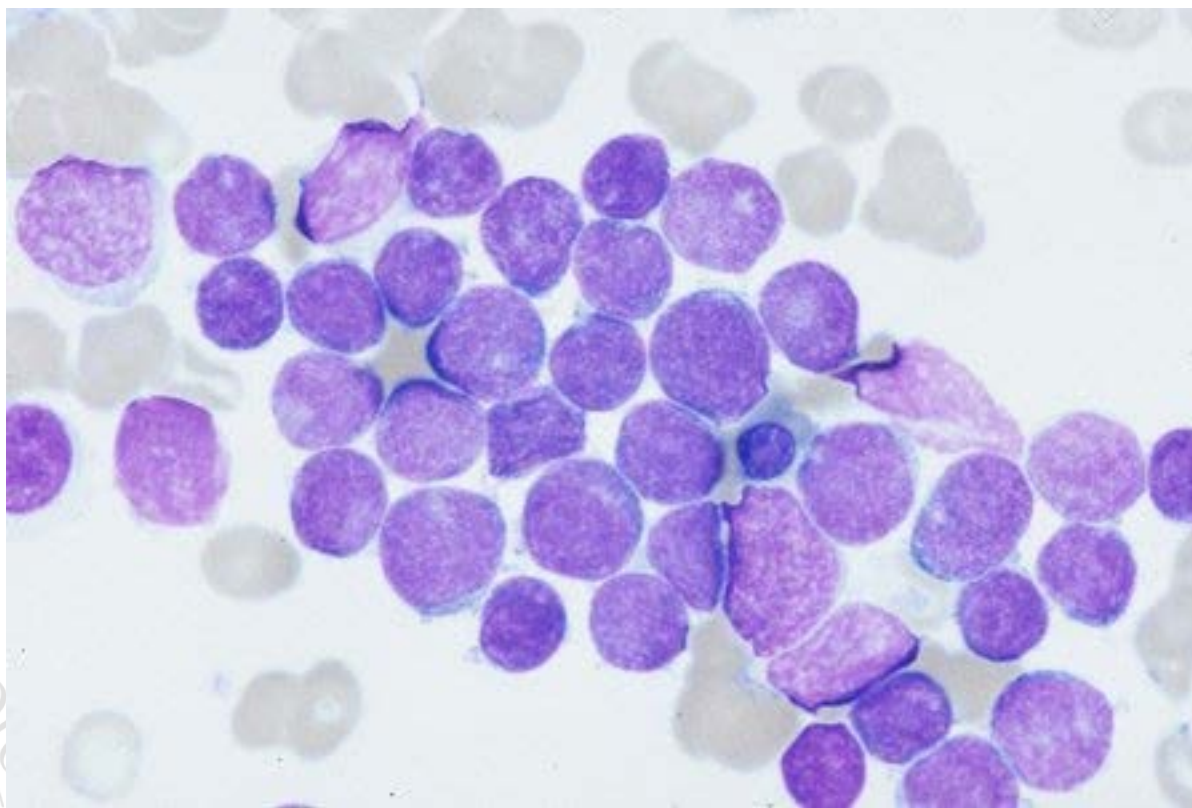
Successivamente viene inoculata endovena una determinata quantità di cellule potenzialmente staminali.

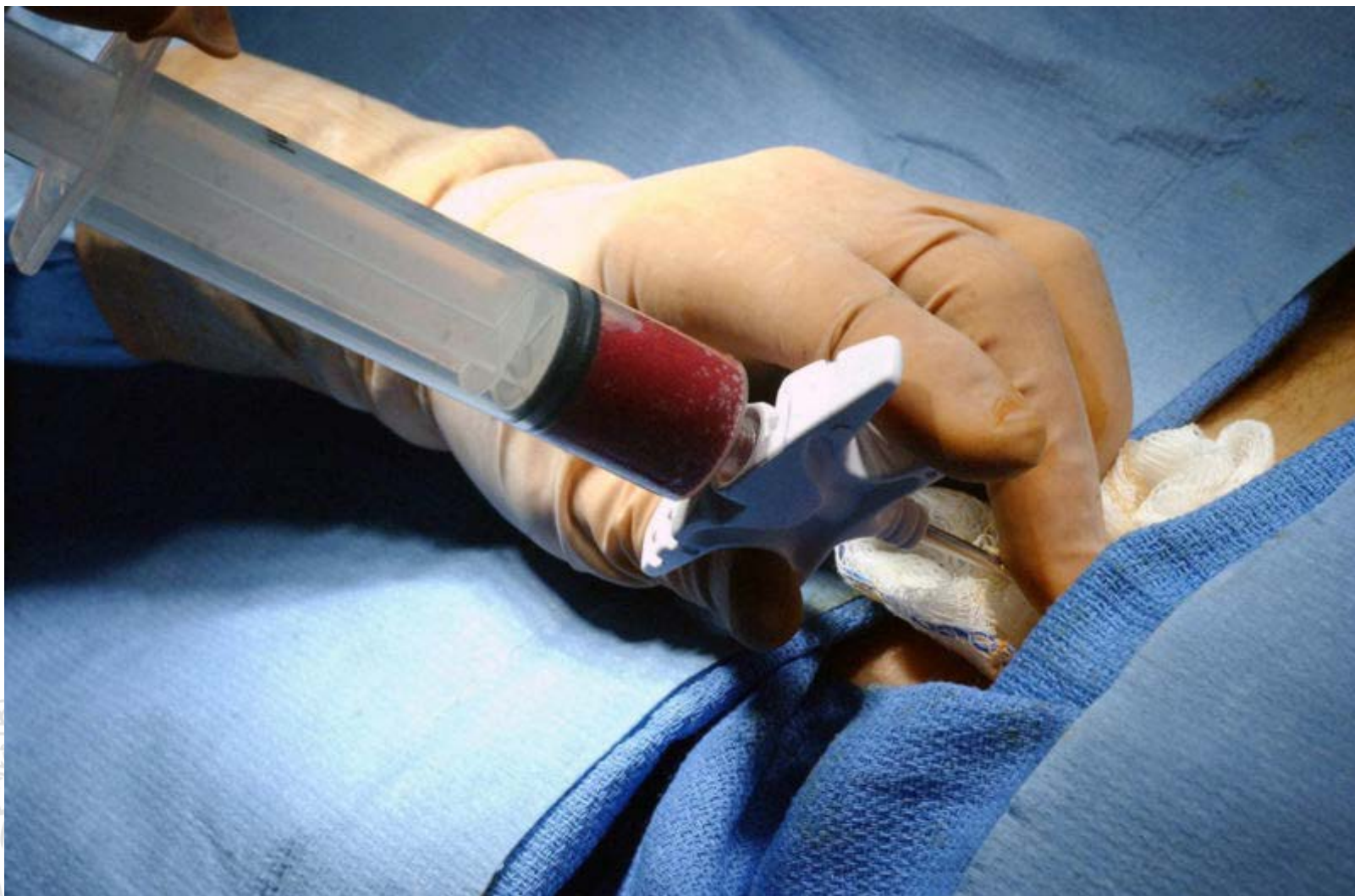
Il totale ripristino della composizione ematopoietica midollare è un chiaro indice di staminalità delle cellule che abbiamo inoculato.

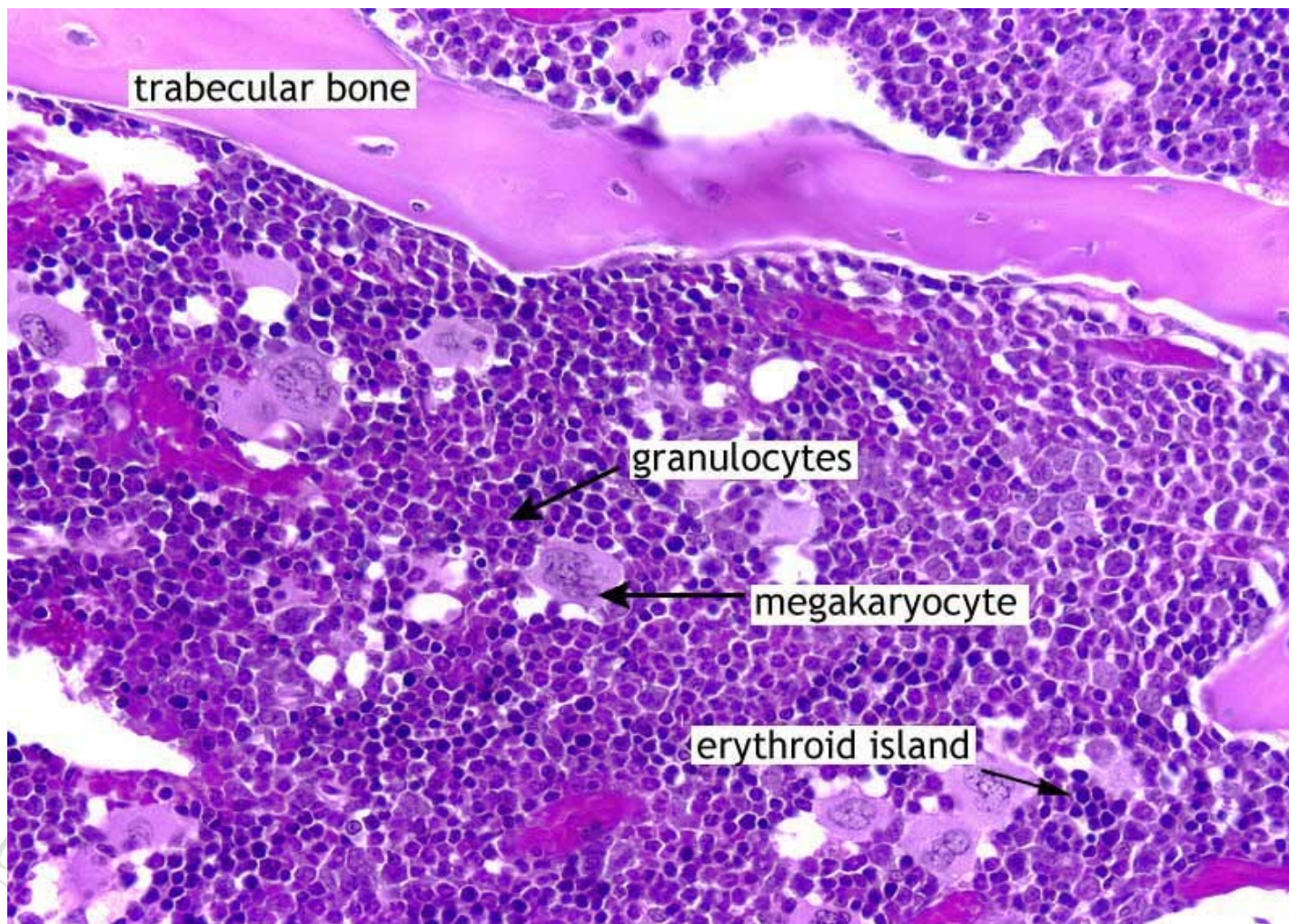




Leucemia

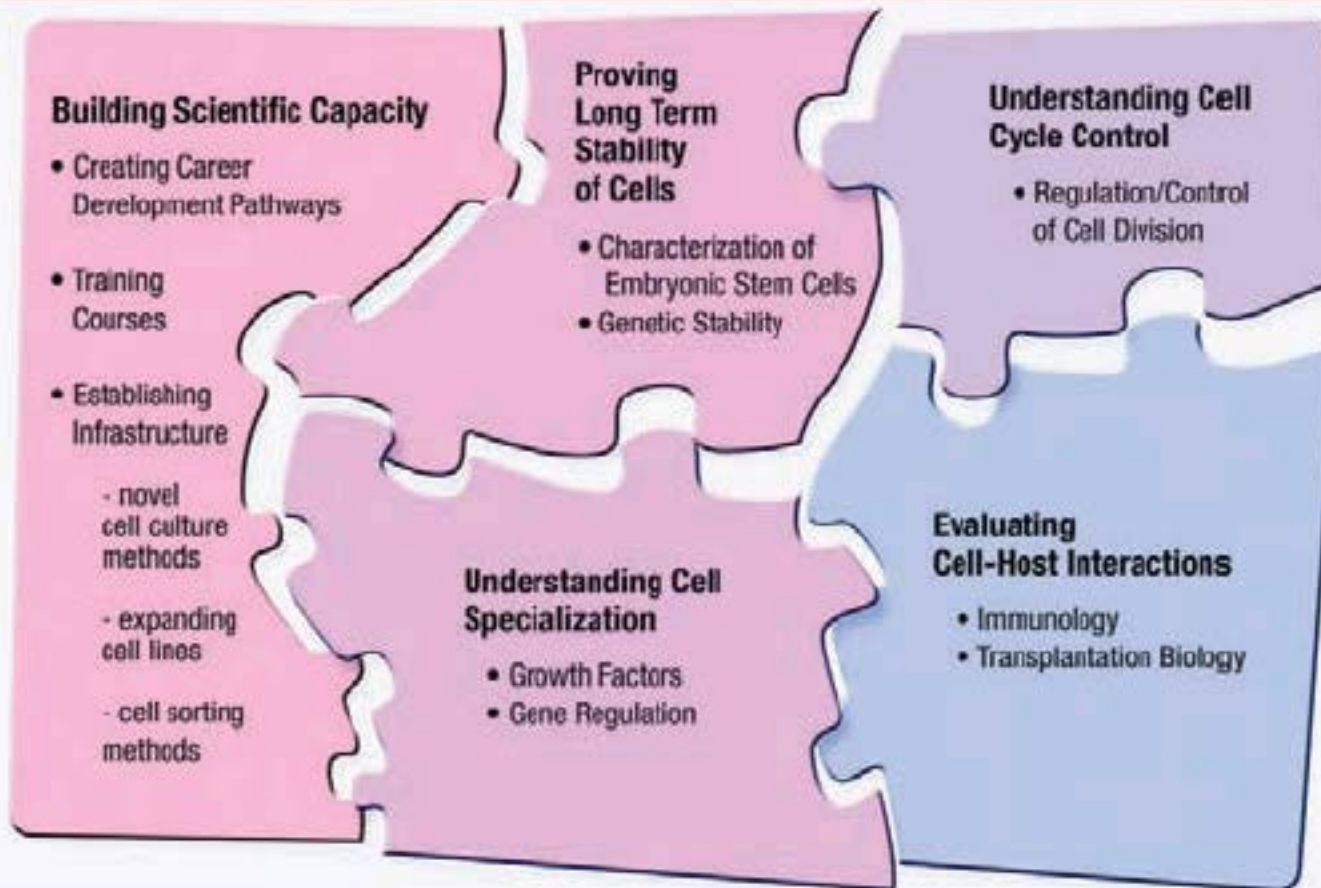






The Scientific Challenges of Human Stem Cells

Basic Research Phase



Sicurezza nell'impiego di cellule staminali

L'uso di cellule staminali in studi clinici e successivamente in terapia, deve essere strettamente controllato al fine di minimizzare il rischio di tossicità ed assicurarsi che la popolazione cellulare non perda il proprio controllo proliferativo creando così un rischio di neoplasia.

Solo dopo aver verificato queste condizioni si può iniziare a testarne l'efficacia.

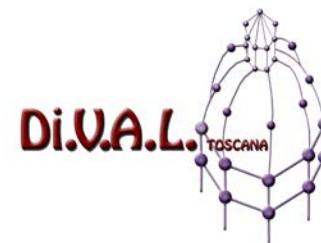


Di.V.A.L. Toscana

Di.V.A.L. Toscana è uno spin-off dell'Università degli Studi di Firenze che si inserisce nel settore della ricerca farmaceutica e traslazionale in ambito oncologico ed onco-ematologico.

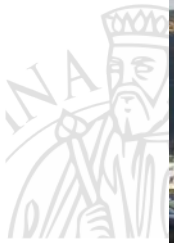
L'azienda fornisce **servizi di sviluppo preclinico** per la validazione di composti farmaceutici, nelle fasi di *Drug Discovery* e *Drug Development*.

Il laboratorio di Di.V.A.L. Toscana è abilitato ad operare secondo la normativa ministeriale di **Buone Pratiche di Laboratorio (B.P.L.)**; l'importanza di lavorare secondo rigorosi standard nazionali ed internazionali, permette all'azienda di garantire la sicurezza e l'affidabilità dei test eseguiti.





Incubatore Universitario Fiorentino



MODELLI ANIMALI

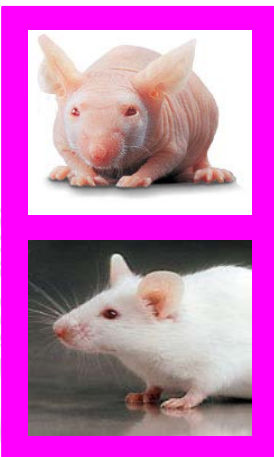


Università degli Studi di Firenze



L.I.Ge.M.A.

(Laboratory of genetic engineering for the production of animal models)



•nu/nu mice

and

•NOD/SCID mice

xenograft models

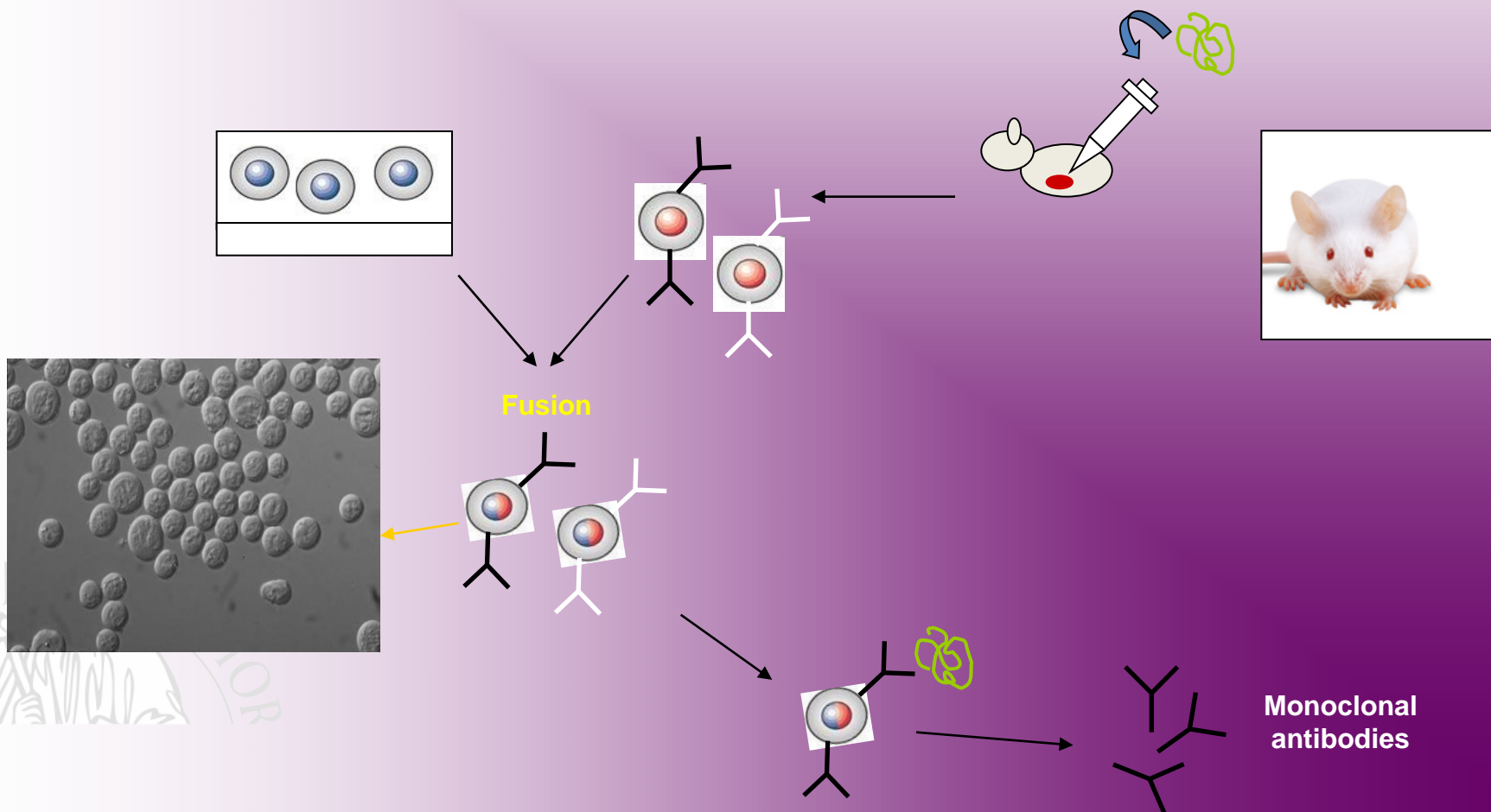
Pronuclear microinjection

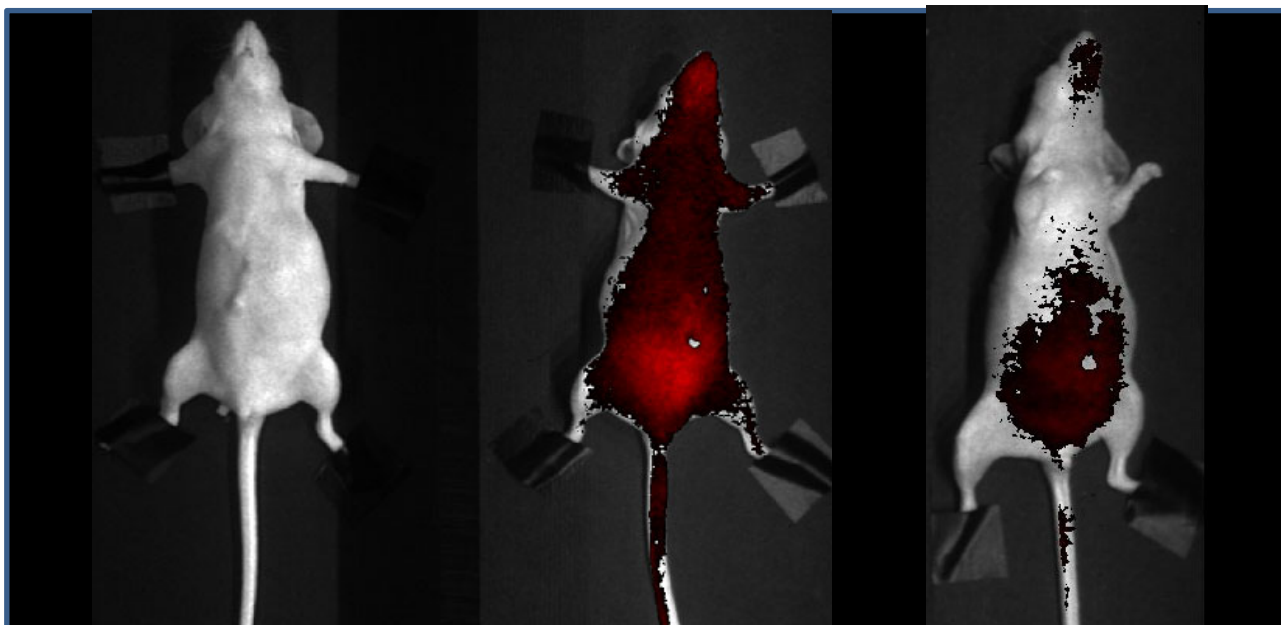
or

Gene targeting in ES cells



Produzione di anticorpi





CONTROL

**mAb-680
Day2**

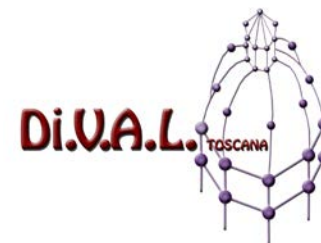
**mAb-680
Day4**

Di.V.A.L. Toscana

La sicurezza di una linea cellulare staminale deve essere garantita prima di poterla impiegare in ricerca o sperimentazione pre-clinica.

Di.V.A.L. Toscana è in grado di svolgere quest'analisi mediante specifici test *in vitro* ed *in vivo*:

- Test di determinazione del cariotipo
- Test di clonogenicità
- Gene expression profiling
- Test di tumorigenicità *in vivo*

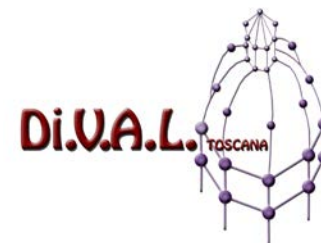


Di.V.A.L. Toscana

Di.V.A.L. Toscana è uno spin-off dell'Università degli Studi di Firenze che si inserisce nel settore della ricerca farmaceutica e traslazionale in ambito oncologico ed onco-ematologico.

L'azienda fornisce **servizi di sviluppo preclinico** per la validazione di composti farmaceutici, nelle fasi di *Drug Discovery* e *Drug Development*.

Il laboratorio di Di.V.A.L. Toscana è abilitato ad operare secondo la normativa ministeriale di **Buone Pratiche di Laboratorio (B.P.L.)**; l'importanza di lavorare secondo rigorosi standard nazionali ed internazionali, permette all'azienda di garantire la sicurezza e l'affidabilità dei test eseguiti.

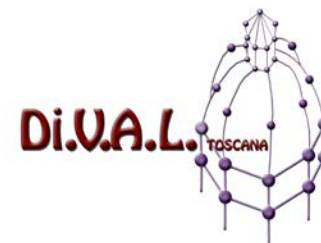
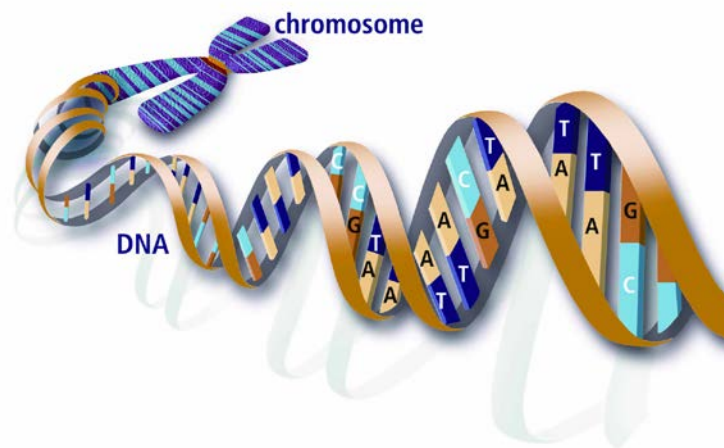


Determinazione del cariotipo di cellule staminali

L'obiettivo del test in questione, è valutare l'assetto cromosomico di una linea cellulare al fine di escludere assenza di alterazioni cromosomiche.

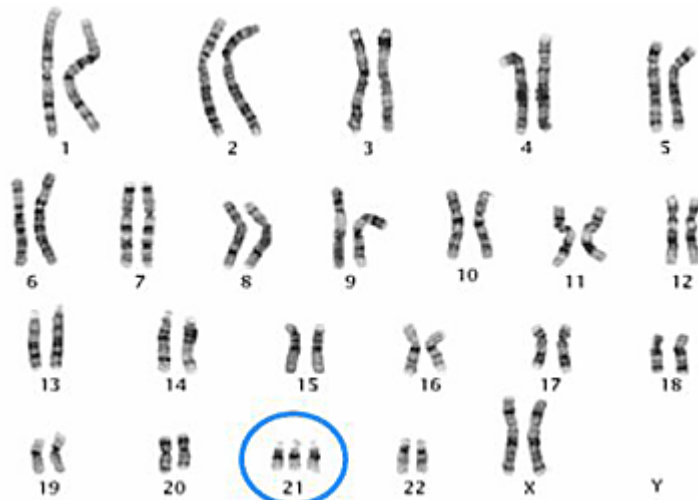
Questa analisi citogenetica risulta fondamentale per saggiare la sicurezza della linea cellulare staminale in esame.

Valutare la tendenza di una linea cellulare ad accumulare mutazioni, è un passo cruciale prima dell'impiego di tali cellule in ricerca o in sperimentazione clinica.

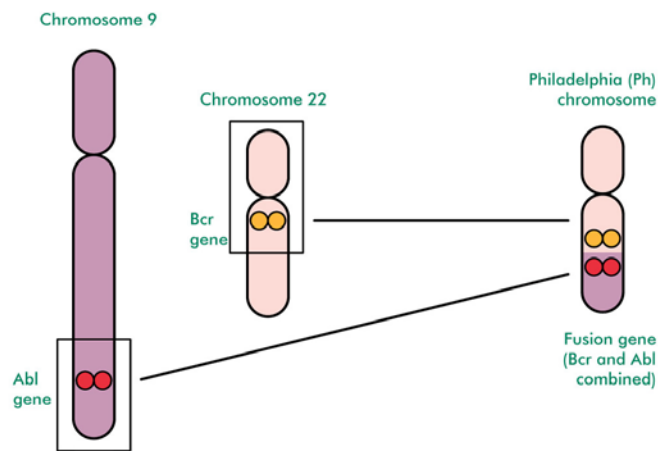


Determinazione del cariotipo di cellule staminali

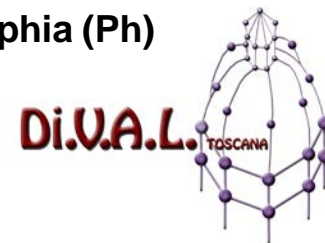
La valutazione dell'assetto cromosomico è un'analisi fondamentale; infatti anche la più piccola modificazione genomica potrebbe avere gravi conseguenze



Trisomia 21



Cromosoma Philadelphia (Ph)



Test di clonogenicità: soft agar assay

Questo studio permette di verificare la capacità clonogenica di una determinata linea cellulare, ovvero la capacità di formare colonie in assenza di adesione al substrato .

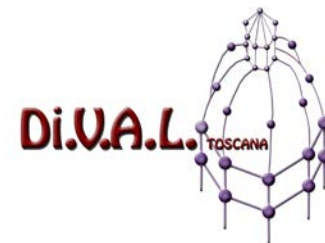
La crescita in terreno semi-solido è generalmente utilizzata come indice di trasformazione neoplastica connessa alla tumorigenicità.

La formazione di colonie in soft agar rappresenta un comune metodo per monitorare le capacità ancoraggio-indipendenti di cellule tumorali e paragonarle con quelle di cellule non tumorali.



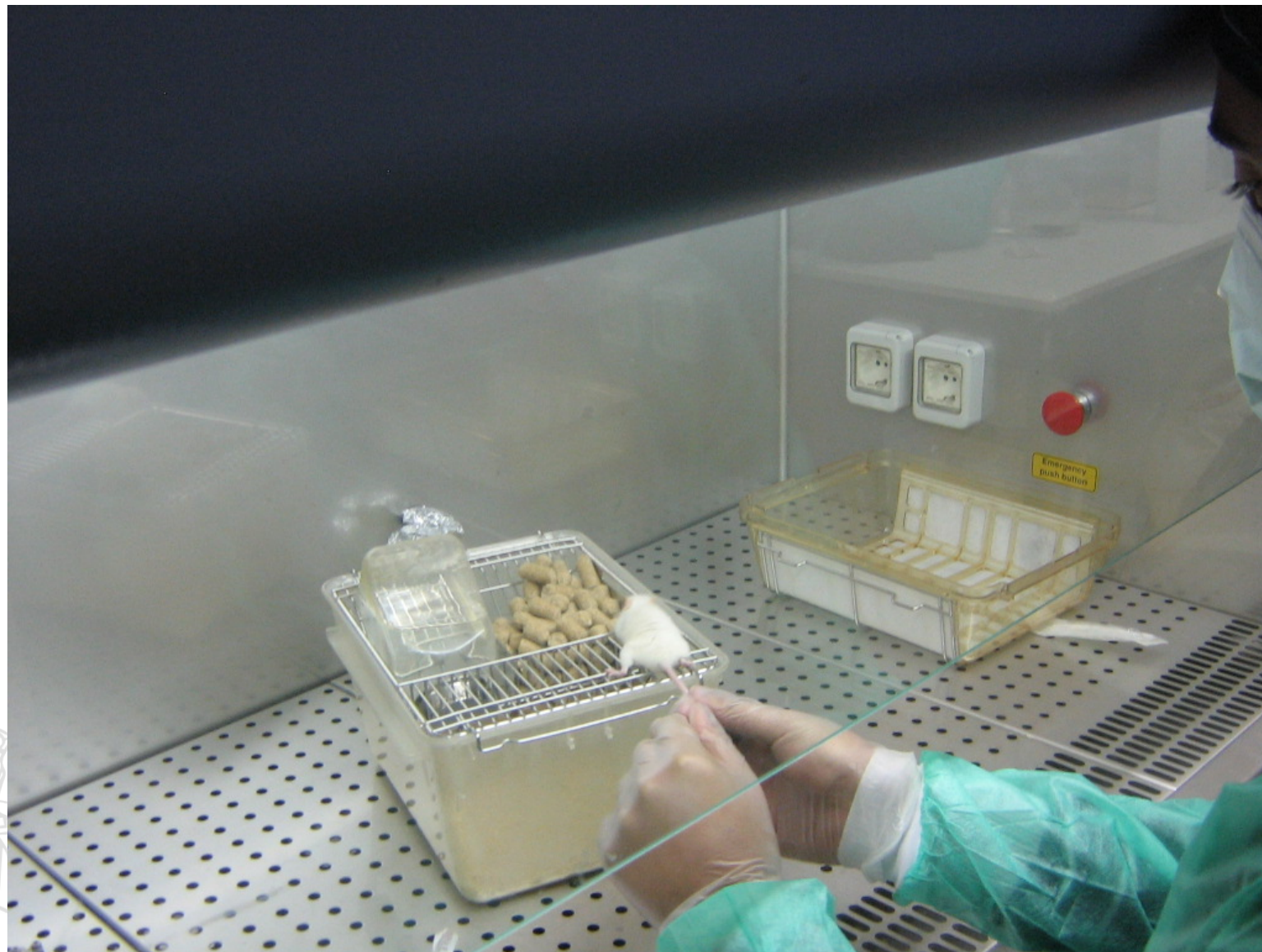
Gene expression profiling

Confrontando l'espressione genica di una linea cellulare staminale nota con delle cellule con un profilo genetico da analizzare, è possibile determinare la staminalità di quest'ultime valutando l'up-regolazione o la down-regolazione di determinati geni.











Test di tumorigenicità *in vivo*

La linea cellulare staminale da testare viene inoculata sottocute su un fianco dell'animale (topo, ratto, cavia); sull'altro fianco viene inoculata la stessa quantità di una linea cellulare tumorigenica che fungerà da controllo positivo.

L'osservazione quotidiana degli animali permette di valutare la formazione o meno di masse neoplastiche.



Presenza di massa tumorale



Assenza di massa tumorale

