

Immune Checkpoint

Cosa sono gli Immune Checkpoint?

Sono parte fisiologica del SI e impediscono una **risposta immunitaria eccessiva**.

Come funziona?

Si attiva quando le proteine superficiali delle cellule T **riconoscono e si legano a proteine partner** su altre cellule (es: tumorali). Queste insieme, inviano un segnale **"off"** alle cellule T. *Ciò può impedire al SI di distruggere il cancro.* I farmaci **inibitori del checkpoint** bloccano il legame => e l'invio del segnale "off", consentendo alle cellule T di uccidere le cellule tumorali.

Quali sono le proteine target dei farmaci?

PD1 e CTLA4

PD1 o Morte cellulare programmata 1

Mantiene la **toleranza periferica** e mantiene la **risposte delle cellule T entro un intervallo fisiologico desiderato**.

Poiché il sistema di regolazione PD-1 / PD-L1 è indotto da risposte immunitarie, questo dà **feedback negativo** attenuando le risposte locali delle cellule T e riduce al minimo i danni ai tessuti.

CTLA4 o Linfocita T citotossico antigene-4

Sono espressi dai linfociti T naive.

Stimola PD1 su linfociti T attivi. Induce **anergia**

Anergia

Cioè l'incapacità di rispondere ad un dato antigene da parte di un linfocita.

Terapia cellulare delle Malattie Cardiovascolari

Obiettivo: ricostituire la massa contrattile del cuore e impedire che quest'ultimo vada incontro a scompenso cardiaco.

Si è pensato d'usare:

▶ **Cellule staminali dell'adulto prelevate da midollo osseo**

▶ **Cellule staminali mesenchimali** (cellule che danno sostegno e nutrimento al midollo osseo), mioblasti scheletrici,

▶ **Cellule staminali cardiache** residenti nel cuore.

▶ **cellule staminali embrionali** variamente differenziate.

▶ Trans-differenziamento di **fibroblasti** in cardiomiociti.

▶ **Stimolazione della rigenerazione endogena**.

Riguardo la somministrazione si va per:

▶ **Via intra-venosa** (possono sentire specifici segnali e possono fare homing nella parte di cuore ischemico)

▶ **Via intra-coronarica:** favorisce l'adesione delle cellule

▶ **Iniezione diretta nel cuore:** tramite fattore di crescita ematopoietica => facilitano l'ingresso.

▶ **Via trans-endocardica** (sistema NOGA: mappa l'attività elettrica)

➤ **Piero Anversa** => Cazzata => **antigene di superficie c-kit:** Le cellule purificate per questo antigene, se iniettate nel cuore, possono differenziarsi in cardiomiociti e cellule dei vasi.

Terapia cellulare delle Malattie Cardiovascolari (cont)

Si è provato a dimostrare che gli EPC, derivanti dal midollo osseo, avevano la capacità di incorporarsi nei vasi sanguigni dell'adulto e di generare vasi. Gli EPC esprimono particolari marcatori di superficie (**CD133, CD34, VEGFR2**) e specifiche proprietà di adesione. => Si sono susseguiti vari lavori che hanno dato **mixed result per mixed cells**: 1) **REPAIR-AMI:** Iniezione di EPC per *via intra-coronarica nell'infarto miocardico acuto*. **Risultato** => 5% di miglioramento: poco utile.

2) **STOP-Care:** 1% di miglioramento dell'elezione.

3) **BOOST:** Trapianto di cellule di midollo osseo per *via intra-coronarica in seguito ad infarto*.

4) **ASTAMI:** *iniezione intra-coronarica di cellule mononucleate* derivanti da midollo osseo. Nessun miglioramento a 6 mesi.

Cos'è successo? Molti degli eventi inizialmente riconosciuti come trans-differenziamento erano in realtà **eventi di fusione!** Esperimenti con GFP: cellule tetraploidi = evento di fusione!

▶ Le cellule che sopravvivono hanno effetto paracrino di **cardio-protection** => secernono fattori di crescita che fanno un po' bene al cuore.

Le ESC sono definite tali se:

1) Formano **embryoid bodies** in coltura (colonie sferiche in cui la componente staminale sta al centro e la componente più differenziata sta in superficie).

2) Se impiantate in una sede ectopica formano teratomi.

3) Se iniettate in una blastocisti in formazione formano una chimera.

Terapia cellulare delle Malattie Cardiovascolari (cont)

➤ Altro fallimento è dato dai **mioblasti scheletrici** che sono cellule staminali del muscolo, dette anche **cellule satellite**, e se iniettate in cuore di ratto riescono a sincronizzarsi, esprimere le connesine e contrarsi in modo sincrono con i cardiomiociti. Fase 1 promettente **Fase 2**: No rigenerazione e *causa aritmie*.

➤ *Piero Anversa* => Cazzata => **cellule staminali cardiache** che esprimono c-kit: generano cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce. Due sperimentazioni:

- ▶ **SCIPIO** purificò le cellule in base all'espressione di c-kit seguita da iniezione a livello del miocardio => effetto clinico molto modesto.

- ▶ **Marban e Cardiosfere**: isola le cell. staminali.

Si è dimostrato che non funziona!

➤ Una strategia che potrebbe funzionare è quella di **istaurare un processo di riparazione endogena**. Studi in **zebrafish**: in seguito alla resezione cardiaca, i cardiomiociti sdifferenziano e dis-assemblano la propria struttura sarcomerica fanno il ciclo cellulare e si ri-differenziano. => Dimostrato in bimbo a cui è stata aperta un'arteria occlusa che ha avuto un'infarto => 45gg dopo aveva recuperato la funzionalità cardiaca!

EPC = Endotelial progenitor cells

=> Marban ha ritrattato dicendo che le cellule di cardiosfere non sono in grado di rigenerare il cuore ma fanno bene in virtù dell'effetto paracrino

Cell Therapy per Schlerosi Multipla

Cos'è?

Malattia **autoimmune** che distrugge gli oligodendrociti che producono mielina.

Strategia 1?

Si differenziano da **cellule staminali embrionali** gli oligodendrociti in coltura => identificata una popolazione di progenitori di oligodendrociti, in coltura possono differenziarsi in: astrociti e neuroni.

Strategia 2?

Trapianto di **cellule autologhe di Schwann**, che producono la mielina. => Funziona in scimmia, protocollo in atto per l'uomo.

Cell therapy per la SLA

Strategia 1?

Indurre il differenziamento di neuroni da **cellule staminali embrionali** => a partire da **ectoderma primitivo** si sviluppano **motoneuroni**. Mai provati in vivo, hanno assoni corti e meno dendriti.

Strategia 2?

Cellule derivate dalle gonadi: **embryonic germ cells** => pluripotenti. Si sono isolati progenitori neuronali specifici sulla base di markers: la **nesitina** e l'**enolasi neruon-specifiche**. Queste cellule sono state iniettate nel midollo spinale dei ratti modello. Lo stesso ratto è poi in grado di muoversi una volta trapiantatati.

Strategia 3?

Neural stem cells di origine fetale iniettate nel midollo spinale. Non ci sono ancora risultati dello studio di fase 2!

Silencing

➤ Oligontd antisenso

permettono di inibire l'espressione di geni. **Esempi**: pomodoro; apoB100 => Farmaco **KYNAMRO**; retinite da citomegalovirus => Farmaco **Fomivirsen**.

➤ Co-Soppressione

Si ha quando c'è soppressione dell'espressione sia del **gene endogeno**, sia del **gene introdotto**. Responsabile: **dsRNA** con:

- ▶ inattivazione in modo *specifico* ;
- ▶ **post-traduzionale**;
- ▶ ne basta **poco** nel citoplasma;
- ▶ **degrada l'mRNA del gene**;
- ▶ è **trasmissibile**

Infezione in **C. Elegans** di dsRNA per il gene **Unc22** (dei miofilamenti). Risultati: **Knock-out** => il verme si contrae su se stesso.

➤ SiRNA e MicroRNA

Nb: *I siRNA sono creati per avere un appaiamento perfetto mentre nei miRNA no!*

Dicer è una RNasi che taglia il dsRNA, usa ATP, e produce tanti piccoli siRNA. Questi sono **iRNA** che sono incorporati nel complesso proteico chiamato **RISC (Rna Inducing Silencing Complex)** e s'incorpora solo uno dei due filamenti di RNA: il **filamento guida**, questo cerca il corrispettivo mRNA, lo riconosce e lo taglia. Quello che taglia è la proteina chiamata **Ago2 (Famiglia degli argonauti)**.

Knockout per **Dicer** in topo che è una mutazione **letale!**

➤ Random degradative PCR



Silencing (cont)

Nei **vermi**: iRNA possono essere ereditati attraverso più generazioni. La **rdRP** usa il filamento guida di siRNA come **primer** per sintetizzare nuovo filamento RNA, e usa l'mRNA target come stampo => crea altri dsRNA, che possono essere elaborati da Dicer a dare nuovi siRNA. => *si amplifica l'effetto del silenziamento!* Meccanismo non presente nei mammiferi.

Nei **mammiferi**: C'è un'unica molecola di sRNA che ha una forma a forcina detti quindi **Short Hairpins**. Sono formati da un unico strand di RNA => codificati da DNA espresso da un vettore virale. Usi per malattie di tipo gain-of-function.

➤ **mi-RNA** => controparte endogena dei siRNA

- 1) trascritti come **pri-miRNA**
- 2) sono processati dall'enzima **DROSHA** a che li converte a **pre-miRNA**.
- 3) Il pre-miRNA è trasportato dal nucleo al citoplasma dall'**esportina-5**
- 4) Nel citoplasma è riconosciuto da **DICER** => taglia la porzione a forcina e si ha un **RNA duplex simile al siRNA**
- 5) Questo è incorporato da **RISC** e portato all'mRNA bersaglio.

▶ **Knockout** in C. Elegans per i geni della formazione di miRNA => problemi dello sviluppo

I geni dei miRNA sono:

- ▶ **molto conservati** (esoni ed introni)
- ▶ a volte **extragenici**.
- ▶ Localizzati in **cluster**.
- ▶ Famiglia = Stessa **seed sequence**.

Silencing (cont)

▶ Inibizione di circa 200 geni grazie all'**appaiaimento imperfetto** nella regione **3'UTR**. => inibizione della traduzione.

In terapia genica si usano per :

- 1) **evitare la risposta infiammatoria** mettendo la sequenza bersaglio dei MIRNA a valle del gene terapeutico, selettivamente espresso in HSC.
- 2) **bloccare la replicazione virale**: si blocca il MiRNA 122 del virus dell'epatite C con il **Miravisen** (Un LNA).

RNA polimerasi RNA-dipendente = RdRP
pri-miRNA = Primary Micro RNA
 LNA = locked nucleic acid

Cell Therapy del SNC

▶ *Strato dei granuli del giro dentato dell'ippocampo e zona subependimale periventricolare* => **attività di neurogenesi anche nell'adulto**. Qui ci sono cellule che rispondono ai fattori di crescita => **cellule staminali neurali** creano cellule **non differenziate**, le quali creano cellule differenziate (**neuroni e cellule della glia**).

Tessuto simile alla **nicchia ematopoietica** a livello del midollo osseo!

- ▶ Negli animali il **bulbo olfattivo si rinnova di continuo** => Alte capacità olfattive! La neurogenesi è condizionata da:
 - ▶ Ambiente **ricco di stimoli** ↑ la neurogenesi;
 - ▶ L'**attività fisica** ↑ la neurogenesi;
 - ▶ **Risposta agli stress positiva** ↑ la neurogenesi (depressione: ↓ neurogenesi)
 - ▶ L'**alcool** ↓ la neurogenesi
 - ▶ L'**invecchiamento** ↓ la neurogenesi
 - ▶ La **mancaanza di sonno** o jet-lag ↓ la neurogenesi

Cell Therapy del SNC (cont)

Le cellule staminali neuronali si mantengono in coltura ed espandono:

- 1) **Neurosfera**: Crescono in forma di sfera in assenza di fibroblasti mitoticamente attivi. Richiedono la presenza di fattori di crescita: FGF2 e EGF.
- 2) **In substrati** (anche immortalizzate): Una sfera viene fatta aderire ad un substrato di laminina o altre matrici. Questi promuovono l'attaccamento e sono spinte a differenziarsi in neuroni.

▶ Le cellule staminali neuronali possono essere indotte a differenziarsi in cellule del sangue. Inoltre le HSC possono generare neuroni in vitro. => prelievo di midollo osseo in topo transgenici marcati. Iniettando HSC iniziano ad esprimere markers neuronali nel cervello. Sfruttano marker fenotipici, **NB possibili eventi di fusione**. => **No benefici clinici**. =>

Dimostrare la **sopravvivenza e funzionalità in termine di neurotrasmettitori**, e devono stabilire anche **connessioni appropriate**. ➤ Le **neural stem cells** che originano nello strato **sub-ventricolare** migrano attraverso la **RMS** come **neuroblasti** ed esprimendo il marker **DCX**, per raggiungere il bulbo olfattivo. Qui c'è una nicchia neurogenica in cui il vi è il mantenimento della staminalità. La **neurogenesi del bulbo olfattivo** => olfatto e riconoscimento sociale.

➤ La **neurogenesi ippocampale** => apprendimento e movimento spaziale, memoria spaziale a lungo termine, riflessi condizionati da paura e clearance della memoria ippocampale.

Cell Therapy del SNC (cont)

➤ L'**introito alimentare** è correlato a neurogenesi: a livello ippocampale ci sono neuroni che influiscono sul differenziamento di neuroni ipotalamici in due tipi principali:

1) **Responsivi alla leptina** e al digiuno per ↑ l'introito di cibo.

2) Quelli **Cart**(Cocaine Amphetamine Regulated Transcript) servono per ↓ l'introito di cibo, altri ↑ l'introito di cibo.

Cellule neuronali derivanti da cellule ES: pluripotenti e tumorigeniche, poco usate.

Mem. a breve termine:nuove sinapsi tra neuroni **già presenti**

Mem. a lungo termine:**nuovi neuroni** che stabiliscono connessioni in aree del cervello poco rinnovabili

Studi C14:Basso rinnovo in **cervelletto**, alto in **incorteccia cerebrale**

Modelli animal*:roditori; pecore; primati.

Sonno:Il sonno profondo è interrotto dal sonno REM, simile allo stato di veglia (onde poco ampie e molto veloci)

RMS =Rostral Migratory Stream

Medicina Rigenerativa

Usa: **Cellule Staminali**, divise in:

1)**embrionali (pluripotenti:** creano tutti i tipi cellulari) Si ottengono: direttamente dall'embrione; attraverso procedure di clonazione; riprogrammazione genetica.

2)**adulte (multipotenti:** non creano a tutti i tipi cellulari) Più o meno presenti in vari organi e tessuti.

➤ **DEFINIZIONE DI CELLULA STAMINALE**

Medicina Rigenerativa (cont)

È una cellula indifferenziata, capace di **self-renewal**, può proliferare indefinitamente e di generare diversi tipi cellulari supportando sviluppo, omeostasi tissutale e riparazione.

➤ **Potenza:** "capacità delle staminali di generare più tipi cellulari". Ci sono diversi tipi:

▶ **totipotente** = lo **zigote** e le 2-3 successive divisioni, dà origine a tutte le cellule dell'embrione e anche a quelle della placenta (trofoblasto).

▶ **pluripotente** dà origine a tutte le cellule che compongono i tessuti di un organismo adulto (derivano dai 3 foglietti embrionali) ma non danno origine ai tessuti placentari. Sono le cellule **embrionali**; di carcinomi embrionali o delle gonadi.

▶ **multipotenti e unipotenti** le prime danno origine ad alcuni tipi cellulari (ad esempio le staminali ematopoietiche), mentre le seconde solo ad 1 tipo (tipi cellulari che costituiscono il tessuto da cui provengono). In generale:

Differenziamento = perdita di potenza.

➤ Per coltivare mESC e mantenere il self-renewal servono: uno strato di fibroblasti inattivi e una citochina: **LIF (Leukemia Inhibitory Factor)**. Le ESC umane invece non hanno bisogno di questa citochina.

▶ **LIF:** Mantengono l'espressione dei geni della staminalità. Questi geni sono: **Oct4, Nanog, Sox2 ed una serie di marker di superficie.**

➤ Caratteristiche delle ESC:

▶ Sono Pluripotenti.

Medicina Rigenerativa (cont)

▶ Se impiantate in blastocisti contribuiscono alla formazione dell'embrione => **Chimera.**

▶ Se impiantate in un tessuto non embrionale (Sede Itopica) origina **Teratomi**(Tumori delle gonadi che presentano mix di tessuti e componente indifferenziata).

▶ Risposta a segnali di differenziamento in vitro.

➤ ESC clinica delle malattie:

- 1) Si trapiantano precursori di oligodendrociti (derivanti da ESC) per riparare **danni traumatici del midollo a livello toracico.**
- 2) Differenziamento di ESC in **cellule dell'epitelio pigmentato retinico** per la terapia della degenerazione maculare legata all'età.

Clonazione => Possibili problemi: **Large Offspring Syndrome:** porta a ipercrescita di organi e tessuti e scompenso respiratorio. Causata da problemi nel processo di demetilazione e rimetilazione dei geni nello sviluppo. => Usata per scopi solo di medicina rigenerativa.

iPS: Induce Pluripotent Stem Cells

Si usano 4 geni: **Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4.** Trasformano una cellula differenziata in una indifferenziata, aventi le stesse caratteristiche dell'ESC!

▶ Ma hanno un **potenziale di proliferazione e di self-renewal ridotto,**

▶ **ogni linea cellulare è diversa:** l'effetto finale dipende dalla posizione in cui si integrano i geni della riprogrammazione



Medicina Rigenerativa (cont)

=> usate per creare organoidi e modelli di malattie. Abbinare al genome editing ci permettono di studiare l'effetto delle mutazioni ed effetto di cooperazione tra varianti geniche.

➤ Cellule staminali **adulte**: Non si dimostra un effetto benefico, nonostante gli studi fatti con: HSC (Marche con GFP) in zone infartuate; studi con cellule staminali di midollo che si supponeva facessero homing nel cuore. Le uniche funzionanti sono le **cellule staminali mesenchimali** che danno origine solo a cellule dell'osso, della cartilagine e del tessuto adiposo.

3 usi per le cellule staminali adulte:

- ▶ 1. Produzione di pelle a partire da cellule staminali cutanee.
- ▶ 2. Produzione di midollo osseo a partire da HSC.
- ▶ 3. Produzione della cornea a partire da cellule staminali dell'epitelio corneale

self-renewal = dà origine a cellule uguali a sé stessa

Axolotl: potenziale rigenerativo molto alto.

Zebrafish: rigenera il cuore in 30 giorni, ma anche fuori dal corpo materno, senza lasciare cicatrici. I cardiomiociti vicini alla cicatrice sdifferenziano e proliferano. Poi fanno mitosi e differenziazione terminale in cardiomiociti.

Carbon Dating: Analisi con il c14 nelle persone del 1960 => nel cuore umano c'è capacità di rigenesi nei primi mesi di vita.

Topi Brainbow

Base dell'esperimento?

Ricombinazione mediata dalla **ricombinasi Cre**, capace di riconoscere i siti **LoxP** tradizionali o alternativi.

Come Funziona?

Cre riconosce sequenze in tandem e fa **delezione tra ciò che si trova tra LoxP**. Siti LoxP nella **stessa direzione** si taglia la **zona intermedia**. Orientamento opposto: **swap del frammento intermedio**. Avviene in modo random finché la Cre è presente.

Risultato

Con diversi fluorofori: i neuroni hanno una **colorazione diversa**. Si può seguire la direzionalità dei neuroni.

Cell Therapy del Parkinson

Com'è nata?

Da studi in Messico per trapianti di **cellule produttrici di dopamina** prelevandole dal **surrene**. Risultato => sopravvivono in pazienti con Parkinson

Cell Therapy del Parkinson (cont)

Studi in USA?

Si sono prelevati neuroni dopaminergici da **cervelli fetali** e sono stati trapiantati nella **camera anteriore dell'occhio di ratto** => sono sopravvissute. => Trapiantati nella **zona di sostanza nigra di ratto e scimmia affetti da Parkinson** (MPTP sostanza contaminante che causava il parkinson, è usato per creare modelli animali). **Fase 1** tessuto fetale trapiantato in pazienti => i neuroni possono sopravvivere e innervare lo striato con produzione di dopamina. => **lievi miglioramenti** dei movimenti tipici del Parkinson.

Studio Sham?

Si è dimostrato che questi neuroni **non danno alcun beneficio clinico!** Aumento di dopamina causa **sindromi aberranti!**

Cellule staminali embrionali?

Possono essere indotte a produrre fattori dopaminergici, sviluppati in scimmia e che sembrano funzionanti.

Morbo di Huntington

Da cosa è causata?

Espansione di Triplette.

Cosa si fa?

Si prova a fare **trapianto di neuroni striatali fetali**, dimostrando che questo materiale (graft) persiste.

