

### 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 **tolleranza 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**

#### Angergia

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

### Terapia cellulare delle Malattie Cardiovascolari

**Obbiettivo:** 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.



By [deleted]

[cheatography.com/deleted-101164/](https://cheatography.com/deleted-101164/)

Not published yet.

Last updated 30th November, 2019.

Page 1 of 5.

Sponsored by **Readable.com**

Measure your website readability!

<https://readable.com>

### 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 **irRNA** 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

Not published yet.

Last updated 30th November, 2019.

Page 2 of 5.

Sponsored by **Readable.com**

Measure your website readability!

<https://readable.com>

### 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'**appaioamento 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'**alcol** ↓ la neurogenesi
- ▶ L'**invecchiamento** ↓ la neurogenesi
- ▶ La **manca 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 **corteccia cerebrale**

**Modelli animali\*:** 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.



By [deleted]

[cheatography.com/deleted-101164/](https://cheatography.com/deleted-101164/)

Not published yet.

Last updated 30th November, 2019.

Page 5 of 5.

Sponsored by **Readable.com**

Measure your website readability!

<https://readable.com>