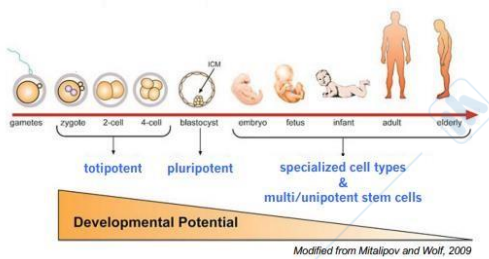


## Developmental potential of adult stem cells



Quello che abbiamo visto fino ad adesso riguarda quello che succede alle cellule staminali nella parte destra di questo grafico: riguarda le cellule che da infant in poi ovvero le cellule staminali adulte che hanno un potenziale differenziativo di due tipi: multipotenza o unipotenza (staminali del muscolo o limbali).

Andando indietro nello sviluppo si osserva Pluripotenza nella fase di blastocisti e nello zigote e primi blastomeri si considerano le cellule TOTIPOTENTI. Queste ovviamente hanno capacità maggiori di potenziale differenziativo (o di

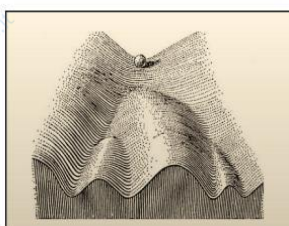
sviluppo).

Quindi il potenziale differenziativo diminuisce man mano che prosegue lo sviluppo: nell'adulto non si trovano cellule totipotenti ma al massimo multipotenti. Si parla quindi di diversa capacità di differenziamento. Il differenziamento è un processo dovuto ad un meccanismo puramente EPIGENETICO.

### POTENZIALE DIFFERENZIATIVO

Ora a me piace rappresentare il differenziamento e questo schema che vi ho fatto vedere prima, come lo immaginava Conrad Waddington che per avere una rappresentazione grafica di quello che lui ipotizzava essere un percorso di sviluppo delle nostre cellule disegnò questo paesaggio epigenetico. È una rappresentazione abbastanza classica che si trova in qualche libro di testo, se vedete l'anno in cui lui ha disegnato questo è paesaggio epigenetico è nel 1957 quindi gli anni 50 del secolo scorso.

### Epigenetics

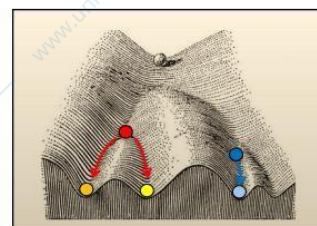


Waddington. *The Strategy of the Genes; a Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology*, 1957

"Epigenetics may be defined as the study of any potentially stable and, ideally, heritable change in gene expression or cellular phenotype that occurs without changes in Watson-Crick base-pairing of DNA."

Goldberg, Allis, Bernstein. **Epigenetics: A Landscape Takes Shape**. *Cell* 2007

### Differentiation as an epigenetic phenomenon



Waddington. *The Strategy of the Genes; a Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology*, 1957

"Epigenetics may be defined as the study of any potentially stable and, ideally, heritable change in gene expression or cellular phenotype that occurs without changes in Watson-Crick base-pairing of DNA."

Goldberg, Allis, Bernstein. **Epigenetics: A Landscape Takes Shape**. *Cell* 2007

Tuttavia, Waddington ipotizzava il differenziamento come un percorso delle cellule che non implicasse appunto il cambiamento della sequenza dei geni, ma appunto come questi geni vengono espressi e la cosa che a me piace molto di questa rappresentazione è che è molto intuitiva.

Se si ha una pallina in cima ad un piano inclinato quella pallina ha un'alta energia potenziale ma man mano che scende diminuirà l'energia potenziale e aumenterà quella cinetica. La pallina che si trova in cima rispetto a quelle più in basso (rosso e blu) ha più vie che può intraprendere ma resta tale ciò che cambia è la sua energia potenziale.

L'epigenetica nella definizione è un processo che coinvolge cambiamenti nell'espressione genica che possono essere ereditati dalle cellule figlie ma che non dipendono da cambiamenti nella sequenza del DNA ovvero non dipendono da alterazioni da modificazioni della sequenza del DNA perché altrimenti sarebbe un processo genico ma è dovuto a diversa organizzazione della cromatina che può essere più o meno accessibile ai fattori di trascrizione.

Allora immaginate questa pallina come una cellula che è all'inizio del suo percorso differenziativo e ha un altissimo potenziale differenziativo, più alto in assoluto. Non c'è nella rappresentazione di Waddington niente sopra. Man mano che quella pallina scende, quella cellula differenzia, succede che scende di per sé il suo potenziale differenziativo e deve intraprendere delle strade per poter scendere. Immaginate questo come un piano inclinato ma fatto di valli e colline. Quindi man mano che scende questa pallina dovrà trovare la sua strada ed è come se una cellula dovesse intraprendere dei percorsi differenziativi che sono magari alternativi uno rispetto all'altro. Quello che abbiamo visto nelle precedenti lezioni è rappresentato nel paesaggio di Waddington come la pallina rossa e la pallina blu. L'altro concetto che è molto intuito in questa rappresentazione è che una cellula blu non potrà mai dare origine ad una cellula gialla, a meno che qualcuno non la prenda e non la sposta d'altra parte del paesaggio epigenetico, ormai ha preso una via differenziativa che la può portare soltanto da questa parte del paesaggio. Ovviamente lo stesso vale per la cellula rossa che può diventare arancione o gialla, ma per poter differenziare e poter diventare una cellula azzurra dovrebbe tornare indietro ma è qualcosa che nell'esperienza di tutti i giorni in genere non avviene: una cellula non torna da sola indietro. Quindi fino a qua è tutto molto intuitivo. L'altra cosa che questa rappresentazione secondo me indica che è molto utile da tenere a mente e che tutto questo è vero, però la pallina sempre pallina è! Immaginate un pallone da calcio che scende, anche quando arriva sotto sempre pallone da calcio è, non è che è cambiata la natura fisica del pallone da calcio ma è cambiata la sua posizione e la sua energia potenziale. Allo stesso modo queste sempre palline rimangono, dovunque sia nel paesaggio epigenetico sempre palline rimangono. Allora io vi ho detto che nell'adulto troviamo delle cellule che sono unipotenti o multipotenti. In questo schema se vogliamo una cellula rossa è multipotente mentre la cellula blu è unipotente. Quindi una cellula rossa può diventare o gialla o arancione, mentre quella blu solo azzurra. Hanno ancora entrambe del potenziale differenziato ma non è quello che aveva la cellula all'inizio, la cellula progenitrice all'inizio del percorso differenziativo.

Quindi va da sé che se vogliamo tornare qua, alla cellula all'inizio del paesaggio epigenetico, è qualcosa che sta in questa fase dello sviluppo embrionale, mentre quello di cui abbiamo parlato fino ad adesso sta in quest'altra fase dello sviluppo embrionale, della nostra vita post-natale.]

Quindi se il differenziamento non è dovuto a modificazioni del gene ma è dovuto alla diversa della sua espressione devo misurare l'espressione del gene.

COME MISURARE L'ESPRESSIONE DI UN GENE? Non esiste mai una sola tecnica ma bisogna scegliere la più ottimale per lo studio da fare. Non è comodo l'uso di un gene reporter sotto il P del gene di interesse perché vado a mutagenizzare la cellula; nemmeno RNA seq perché studia tutto il trascrittoma e richiede tempo; allo stesso tempo anche il WB però richiede un buon anticorpo per la proteina supponendo che questa sia espressa nella cellula; si potrebbe usare un TAG con cui taggare la proteina in modo da avere un Ig molto buono però anche qui si mutagenizza il genoma; Si utilizzava anche il microarray

La tecnica migliore è RT PCR che permette di quantificare il messaggero di interesse all'interno del campione: bisogna retrotrascrivere e poi amplificare per quantificare.

1. Northern blot - 2. Western blot - 3. Real Time PCR - 4. RNA seq - 5. Microarray.

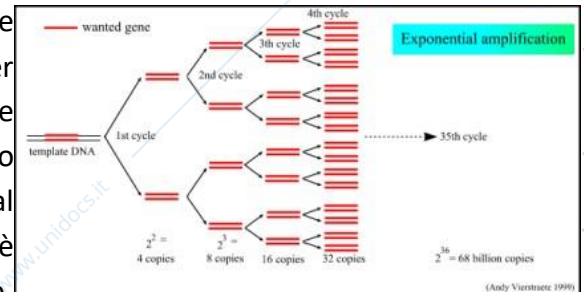
Analizziamo insieme i risultati:

Il 41% di voi ha detto Real Time-PCR, risposta più votata, 1/3 di voi ha detto RNA sequences; Pochi

hanno detto western blot; Un numero decente di persone ha detto northern blot; Pochi hanno detto microarray. Quindi ha vinto, ma di poco sulla RNA seq, la Real Time PCR.

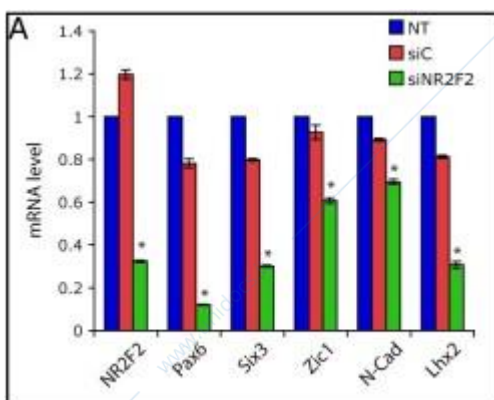
La risposta corretta in realtà poteva essere qualunque delle opzioni, nessuna di queste è sbagliata in termini assoluti. Quindi voi potete usare qualunque di queste tecniche per misurare l'espressione di un gene, ma sono tecniche che comportano un grado di complessità diverso del loro utilizzo è come sparare ad una mosca con un cannone. Quindi se io volessi oggi in laboratorio misurare l'espressione di un gene io utilizzerei probabilmente una Real Time PCR quantitativa, allora ora la vediamo nel dettaglio.

1. Allora per quanto riguarda **Northern blot**, questa è una tecnologia che è stata praticamente soppiantata dalla RT-PCR quantitativa, questa non si usa praticamente più. Northern blot vi permetteva di identificare tramite una sonda radioattiva un campione di RNA.
2. **Western blot** è interessante perché mi permette di vedere la proteina. Perché mi dispiace che western blot sia andata male come risposta? Perché è l'unica tecnica che vi permette di andare a vedere il prodotto finale di quel gene purché ovviamente sia un gene codificante per una proteina.
3. La **Real Time PCR** quantitativa si basa sul concetto della PCR dove io misuro in Real Time quindi in tempo reale il prodotto della amplificazione della PCR facendo incorporare durante la reazione di PCR un composto fluorescente all'interno del DNA che viene sintetizzato. Per cui attraverso una macchina che misura fluorescenza so quante molecole di DNA ho in quel processo di amplificazione ad ogni ciclo da cui si può tramite un calcolo matematico risalire alla quantità di campione presente all'inizio. Quindi quando io ho pochi geni da dover analizzare la PCR Real Time è ottima perché ti permette di fare ciò nell'arco di pochissimo tempo, non ho bisogno di analisi a valle del risultato della PCR Real Time, a differenza della RNA seq nella quale c'è bisogno di un sostanziale supporto bioinformatico.



Cosa che non ho detto: devo prima retrotrascrivere il RNA in DNA e poi amplificarlo.

Quindi tutto questo per dirvi che in questa prima parte di questa lezione per me è importante ritornare un attimo sulle **TECNICHE** che ci permettono di studiare i cambiamenti nell'espressione genica.



Vi mostrerò alcuni lavori scientifico in cui vengono fatte PCR Real Time, e sono delle quantificazioni relative:

Qui ci sono 6 geni analizzati in tre diverse condizioni: blu, rosso e verde. Immaginate tre diverse popolazioni cellulari in cui io voglio analizzare l'espressione di questi geni, potrebbe essere una cellula non differenziata, una differenziata e uno stadio intermedio del differenziamento.

Per esempio, per questo primo gene nella condizione blu il livello di espressione viene settato tipicamente come 1.

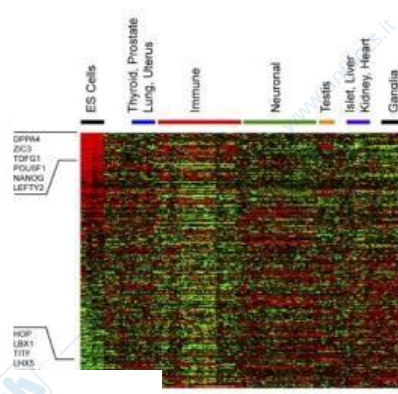
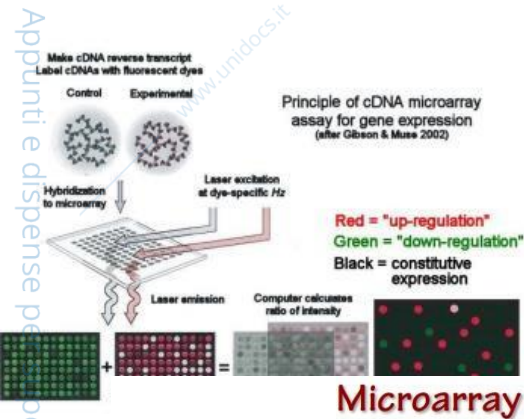
Per me la condizione blu che potrebbe essere la cellula non differenziata è il campione di

riferimento. L'espressione di ognuno di questi geni viene riportata relativa a quell'1. Per esempio, il primo gene aumenta leggermente nello stadio intermedio di differenziamento e poi diminuisce successivamente.

Mentre il secondo gene già diminuisce un po' e poi diminuisce ancora di più.

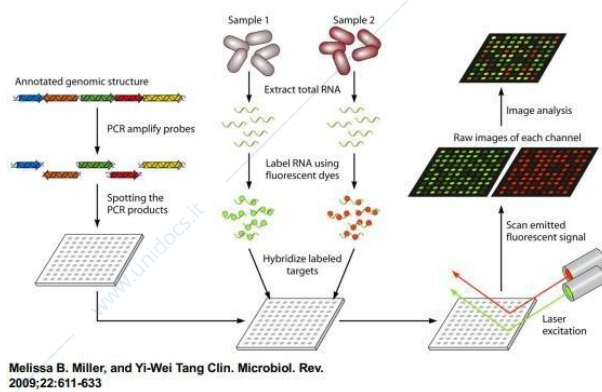
Questo non ci dice nulla sul fatto che il primo ed il secondo gene vengano espressi a livelli uguali, è un risultato utile per il singolo gene. Però è molto semplice da fare, per cui se ad uno viene richiesto di misurare l'espressione di un gene o 5/6 geni non si fa RNA seq ma una Real Time PCR.

4. **Microarray:** Ora è un po' in disuso perché è stata soppiantata dal RNA seq però alcuni lavori che sono particolarmente importanti per capire i concetti che voglio trasmettervi perché sono basati su questa tecnica. Nel microarray voi avete uno spazio fisico il Chip in cui sono fisicamente ancorate delle sonde per un dato gene (sono complementari ad una



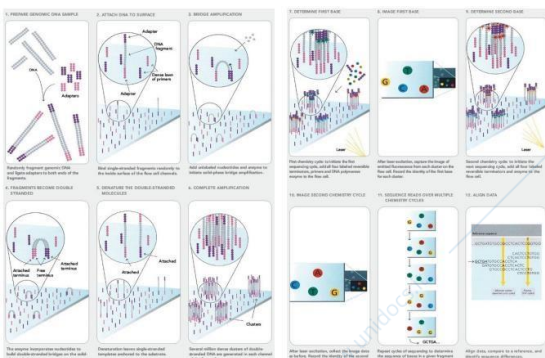
sequenza del gene per una decina di nt) in numero definiti. Io devo avere una conoscenza a priori di quanti geni voglio analizzare, poi su questo microarray vengono fatti ibridare le molecole di cDNA (retrotrascrivo l'RNA in cDNA e lo rendo fluorescente). Quando il cDNA si va a legare a quella specifica sonda, se vedo la fluorescenza vuol

dire che quel campione contiene il prodotto di espressione di quel dato gene. Ovviamente dal confronto tra la fluorescenza ottenuta nel campione e quella nel controllo posso valutare quanto la mia sequenza sia espressa. Tipicamente un microarray veniva massivamente usato quando si aveva ad esempio 350 geni analizzati su una 20nadi campioni diversi.



**RNA sequencing (RNA-Seq)**

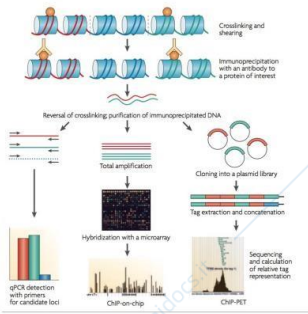
- RNA seq (sequenziamento di nuova generazione di RNA): RNA seq vi permette di identificare anche geni non noti quindi non è necessaria una conoscenza a priori della sequenza da studiare ma è comunque necessario un genoma di riferimento. Per esempio, mi viene in mente lo splicing alternativo: l'arrangiamento diverso di esoni, RNA seq vi permette di identificarlo. Voi non avete limiti nel numero di geni che volete analizzare però richiede un sostanziale lavoro bioinformatico a valle. A differenza della PCR, la RNA seq può richiedere anche diversi mesi da quando si prepara il campione e viene poi sequenziato, e normalmente non si fa all'interno del laboratorio in cui uno sta.on queste tecniche io so se un gene viene



attivato o spento in un dato processo differenziativo.

Quale tecnica utilizzereste per capire se un fattore trascrizionale regola il vostro gene di interesse? La risposta più data è stata: **ChIP** (immunoprecipitazione della cromatina), dando una sola risposta è la risposta corretta però questa non è sufficiente da sola. Questa è una tecnica che si basa sul fatto che voi avete delle proteine che legano il DNA, per esempio un fattore di trascrizione.

**Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)** Se voi volete capire se un dato fattore di trascrizione lega il vostro gene di interesse a livello del promotore del vostro gene, dovete: bisogna aver identificato il promotore, avere una idea di dove sta;



1) avere un anticorpo specifico per il fattore di trascrizione.

a

Se li avete entrambi potete:

2) frammentare il vostro DNA in pezzi più piccoli

F

3) Poi viene utilizzato l'anticorpo contro il fattore di trascrizione di interesse.

Immaginate quindi di avere questo pezzo di DNA in cui un dato fattore di trascrizione si lega al gene rosso e al gene verde, ma non al gene blu.

Quindi blocco l'interazione, frammento il DNA in maniera casuale e genero frammenti di una determinata lunghezza.

4) Poi l'anticorpo viene utilizzato per immunoprecipitare cioè isolare la cromatina legata a quel fattore. Quindi nel mio immunoprecipitato avrò un arricchimento delle sequenze dei geni.

5) A questo punto ho dei pezzi di DNA e a valle di questo posso utilizzare diverse tecniche che permettono di identificare questi geni che erano stati legati dal fattore di interesse e quantificare l'arricchimento. Posso usare una Real Time PCR quantitativa in cui non serve la retrotrascrizione: il rosso e il verde rappresentano i prodotti di amplificazione della Real Time rispetto al blu perché il blu non era stato immunoprecipitato dall'anticorpo. Quindi se io so a priori quali sono i geni di interesse e ne devo analizzare anche 10 mi conviene utilizzare la PCR Real Time, altrimenti posso utilizzare un Microarray dove le sonde sono per i P delle sequenze oppure il sequenziamento di nuova generazione.

La ChIP non è sufficiente da sola per capire se un dato fattore di trascrizione regola il gene di interesse perché il legame di questo fattore su questo gene verde, per esempio, cioè la semplice identificazione che quel fattore semplicemente è legato su quel pezzo di DNA non mi dà informazioni sul tipo di regolazione che quel fattore potrebbe effettuare.

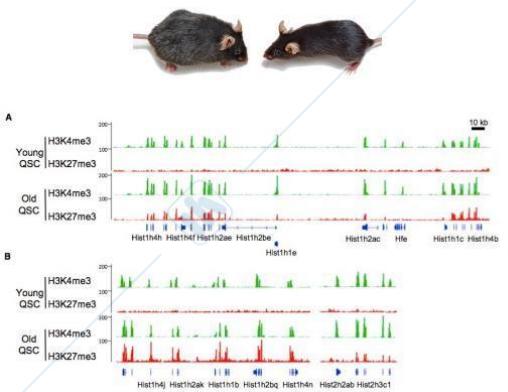
Noi vedremo degli esempi di fattori di trascrizione che possono agire sia da attivatori che da repressori della trascrizione. Quindi con la ChIP so soltanto che quel fattore si lega a quel determinato gene. Ma il fattore è un attivatore o un repressore? Per capirlo dovrei associare alla ChIP con la Real Time PCR oppure la RNA seq.

La ChIP seq permette anche di valutare le modificazioni istoniche sempre per valutare se la sequenza sarà o meno accessibile.

È stato fatto ChIP seq per le cellule satelliti in topi giovani ed anziani per valutare la perdita di potenziale con l'invecchiamento e se questa fosse correlata a modifiche epigenetiche. Sono state prelevate cellule satelliti quiescenti; hanno immunoprecipitato cromatina con un ig per la trimetilazione dell'H3K4 e un ig contro la trimetilazione dell'H3K27. I picchi nel risultato dell'RNA seq rappresentano l'arricchimento delle sequenze. Nel topo giovane c'è arricchimento per la modifica

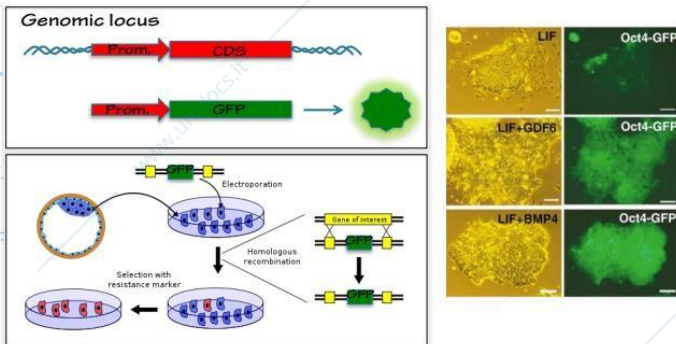
attivatoria ma non per la repressiva quindi un determinato gene è altamente espresso nella satellite della giovane. Nel topo anziano si mantengono i picchi della modifica attivatoria ma compaiono anche picchi di segnale che corrispondono ad arricchimento della modifica repressoria quindi la trascrizione sarà minore per la presenza di repressione.

### ChIP-Seq in satellite cells



### Reporter genes

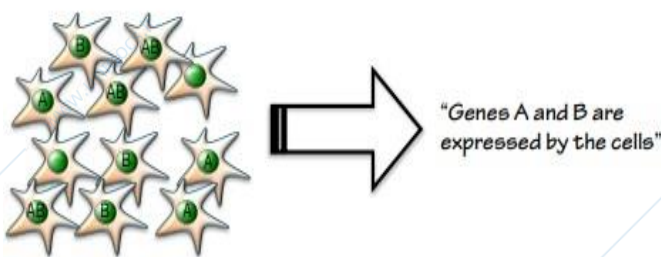
Rapid system, easy to visualize, to define if a specific gene is active in a cell.



Un altro modo per sapere se un dato gene è spento o è acceso è il **Gene REPORTER**. Questo può essere fuso con la sequenza in un costrutto in un plasmide con cui trasfetto la cellula: ogni volta che il P endogeno verrà acceso allora anche il P esogeno lo sarà. Oppure si può sostituire la seq del gene di interesse nel genoma della cellula di interesse con la sequenza del gene reporter. La scelta dipende: nel primo caso bisogna conoscere la seq del P molto bene perché le seq che regolano un gene non sono tipicamente limitate solo al P a monte mentre nel secondo caso se sostituisco il gene con quello reporter

allora il primo non sarà più espresso e la sua trascrizione potrebbe avere dei sistemi di feedback che vengono così alterati.

### A mixed population of cells



Ora immaginate di avere una coltura cellulare, in laboratorio, per esempio avete fatto una biopsia cutanea dal topo oppure dal midollo osseo del topo. Immagino di avere delle cellule che prima esprimono a e poi b. se fermo lo sviluppo che gene avrò espresso in quel momento? Avrò una popolazione di cellule eterogenea:

- 1) Alcune esprimono un gene che si chiama b
- 2) Altre un gene che si chiama a
- 3) Altre né a né b
- 4) Altre entrambi

Però essendo una popolazione mista qualsiasi tecnica che da valore di tutto insieme non mi mostra la relata di cosa sta succedendo nel sistema.

Io dovrei usare altre tecnologie:

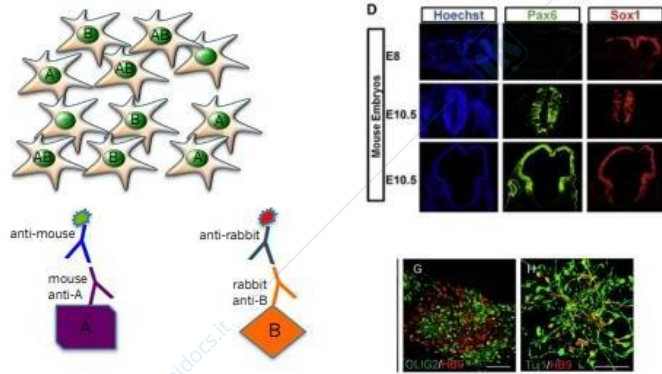
- a) **RNA seq a singola cellula**, perché coinvolge la separazione fisica di una cellula dall'altra e fa analisi del trascrittoma di queste singole cellule.
- b) Se ho solo due geni posso utilizzare delle metodologie alternative per capire quali cellule esprimono a, quali b, quali entrambi e quali nessuno dei due.

**Immunostaining:** si usano anticorpi anti-proteina a e un anticorpo anti-proteina b prodotti in specie diverse: topo e coniglio sono le più usate. Poi utilizzo anticorpi secondari

fluorescenti. Per esempio verde e rosso anti-mouse, cioè che riconosce la porzione fissa dell'anticorpo di topo, e poi quello che riconosce quella di coniglio.

## Immunostaining

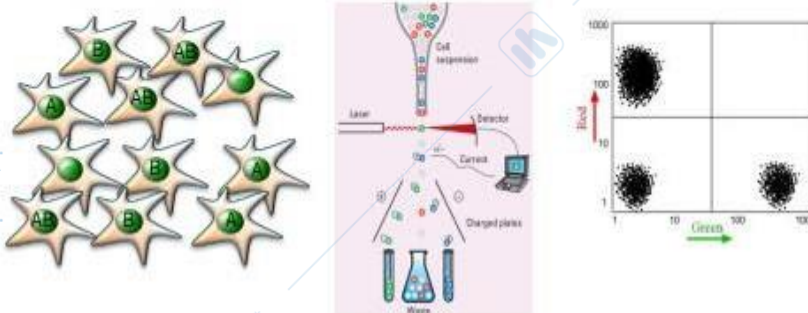
Visualizing endogenous proteins in unmodified cells.



e verde viene indicata con il giallo.

## Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Counting/sorting cells.



**FACS:** una tecnologia simile basata sulla separazione delle cellule attivata da fluorescenza. Io prendo questa popolazione di cellule, la coloro con gli anticorpi e poi la faccio passare attraverso questa macchina che si chiama FACS. Per cui le cellule vengono separate ad una ad una e fatte passare attraverso un capillare e la macchina con un laser riesce a identificare la fluorescenza di un canale o nell'altro, cioè rosso o verde. Poi la macchina conta le cellule: tot cellule verdi ma non rosse, tot

rosse ma non verdi, tot doppie positive e tot né verdi né rosse.

Quindi i risultati sono dei grafici di questo tipo in cui abbiamo da una parte l'intensità di fluorescenza del rosso y e del verde x ed ogni puntino rappresenta una cellula. Nel quadrante in altro a dx mancano le cellule che non esprimono né a né b.

In che modo queste tecnologie ci possono aiutare relativamente proprio al differenziamento?

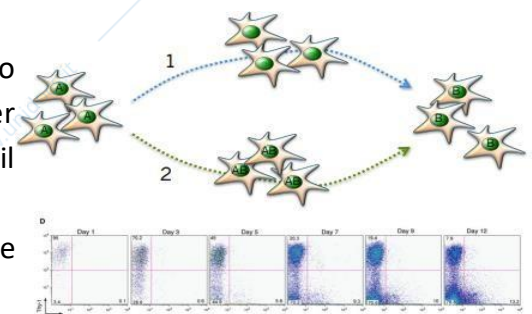
Se stiamo studiando il processo dinamico come il differenziamento delle vostre cellule staminali: sapete che le vostre cellule all'inizio esprimono tutte il gene *a*, alla fine le vostre cellule esprimono tutte il gene *b*. Ci sono due modi attraverso cui si può passare da *a* a *b*:

1. Via numero uno: si spegne *a* e poi si accende *b*.
2. Via numero due: si accende *b*, *a* è ancora acceso. Poi si spegne *a*.

Io voglio capire quali sono i passaggi intermedi.

Questo è il risultato di un esperimento di FACS durante un processo differenziativo in cui avete le cellule che all'inizio sono positive per un marcatore (THA1) e alla fine troviamo delle cellule positive per il secondo marcatore (SSA1).

Guardando lo schema, durante questo processo differenziativo le cellule stanno passando per la via numero 1.



Non è la via numero 2 perché vorrebbe dire che le cellule non diventano doppie positive  $a$   $b$  e poi solo  $b$  positive.

- **Giorno 1:** Questa è la popolazione delle cellule  $a$ , non ho né cellule senza  $a$  né cellule  $b$  né cellule  $a+b$ .
- **Giorno 3:** ci sono ancora parecchie cellule che sono positive per  $a$ , però ci sono anche alcune cellule che si sono negativizzate per  $a$ , perché l'intensità della fluorescenza nel canale  $a$  per loro è bassa, e non sono positive per  $b$ .

➤ Ad un certo punto comincia a comparire una popolazione di cellule nel quadrante sotto a destra che sono cellule che si sono positivizzate per  $b$ , cioè hanno acquisito fluorescenza nel canale  $b$  (nell'anticorpo che marca la proteina  $b$ ) e non sono positive per la proteina  $a$ .

Non si osserva una popolazione nel quadrante in alto a destra che è quello delle doppie positive. Fino alla fine comunque avrò ancora cellule con  $a$  acceso e ciò vuol dire che nella mia popolazione di cellule iniziali non tutte vanno a differenziare contemporaneamente. Questo poi noi lo vedremo nel dettaglio perché quando noi abbiamo una popolazione di cellule staminali, ognuna ha i suoi tempi per acquisire lo stadio differenziato e io voglio capire attraverso quali strade passano è complicatissimo perché tanti geni possono essere accesi e spenti e non è contemporanea questa cosa per tutta la mia popolazione.

4 quadranti (ogni singolo puntino è una cellula):

1. in alto a sinistra: solo  $a$
2. in basso a sinistra: non  $a$
3. in alto a destra:  $a$  e  $b$  positive
4. in basso a destra: solo  $b$

## PLURIPOTENZA DELLE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

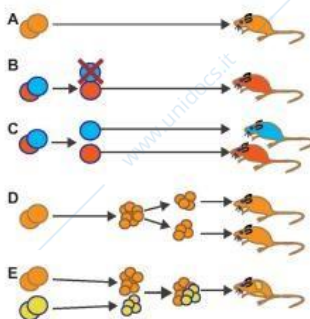
Si tratta di cellule presenti unicamente in embrioni prima di un evento fondamentale dello sviluppo: la gastrulazione. Prima della gastrulazione noi abbiamo delle cellule che consideriamo **totipotenti** e **pluripotenti** che non sono presenti dopo la gastrulazione.

La gastrulazione è quel processo attraverso cui per la prima volta durante lo sviluppo embrionale si separano i foglietti embrionali: ectoderma, mesoderma ed endoderma.

Mentre fino ad adesso noi abbiamo visto cellule staminali adulte che erano: unipotenti (le cellule limbal, le cellule satellite del muscolo) e multipotenti (cellule che generano molteplici tipi differenziali ma sempre all'interno dello stesso tessuto, dello stesso organo. Per esempio, le staminali intestinali che danno 4/5 tipi cellulari diversi o le staminali ematopoietiche).

## Totipotency

**Totipotency:** the ability of a single cell to divide and produce all the differentiated cells in an organism, including extraembryonic tissues. In mammals: zygote.



Ora cominciamo a parlare di un potenziale differenziativo più elevato: la TOTIPOTENZA e la PLURIPOTENZA.

**TOTIPOTENZA:** è la capacità di una singola cellula di dividersi producendo tutti i tipi di cellule differenziate di un organismo. È altamente intuitivo del fatto che lo zigote è una cellula totipotente perché l'uovo fecondato è quell'unica cellula che ha dato origine a ciascuno di noi. Esiste nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale.

**PLURIPOTENZA:** cellule in grado di differenziare in tutti i foglietti embrionali e dare origine alle cellule germinali. Ma le cellule non sono in grado di formare i tessuti extraembrionali che derivano dallo zigote e che nei mammiferi sono necessari per lo sviluppo intrauterino. Esiste unicamente durante la blastocisti.

### **TOTIPOTENZA**

Ma fino a quando questa capacità persiste nello zigote?

Lo zigote è totipotente, ma dopo la prima divisione cellulare i primi due blastomeri sono ancora cellule totipotenti? Poi ognuno di questi blastomeri genererà due cellule figlie, queste 4 cellule sono totipotenti?

Per saperlo dobbiamo fare un saggio funzionale: testarne la capacità differenziativa con un esperimento. In tutti i mammiferi dalla fecondazione all'impianto dell'utero materno gli embrioni possono essere coltivati in laboratorio fino alla blastocisti, non c'è nulla dall'esterno che serve all'embrione per potersi sviluppare fino all'impianto.

Dopo che è avvenuta la prima divisione dello zigote che ha dato due blastomeri questi sono totipotenti in quanto popolazione di cellule o le singole cellule sono totipotenti? Se noi ne eliminiamo una, l'altra da sola è in grado di fare un topo? Sì!

Prelevo uno dei due blastomeri uccidendo l'altra e lo trapianto in una madre surrogata o trapianto entrambi in due madri surrogate diverse ma in entrambi i casi nascono topi che sono geneticamente identici. Un singolo blastomero è in grado di far sviluppare un singolo individuo quindi ha le caratteristiche della totipotente.

PERO' facendo svolgere altri cicli di replicazione fino all'ottenimento della morula (8-16-32 cellule) che viene divisa in due parti uguali da cui dopo il trapianto in due madri nascono di nuovo due topi geneticamente identici. Questo dimostra la totipotenza? No perché dovrei prelevarne una sola cellula per vedere se riesce a formare da solo il topo e si è visto che non lo fa quindi le singole cellule non sono più totipotenti. La totipotenza è una proprietà del gruppo di cellule ma non della singola. QUINDI La TOTIPOTENZA esiste nello ZIGOTE, allo stadio di DUE CELLULE, allo stadio di quattro cellule dipende. Non ha senso dire che le toti sono staminali perché non c'è modo di dimostrare che la totipotenza resti per sempre perché si perde allo stadio di 8 cellule. A quattro cellule dipende dal tipo di specie perché in alcuni sono totipotenti in altri no. Non fanno autorinnovamento illimitato. Quindi se la CELLULA STAMINALE per definizione è una cellula che deve essere in grado di mantenersi indifferenziata e in autorinnovamento in maniera illimitata, va da sé che dallo stadio di 2/4 cellule in poi questa proprietà (l'autorinnovamento) si è persa perché per definizione l'autorinnovamento vuol dire che le cellule figlie devono avere la stessa identica capacità della cellula madre. La totipotenza è il massimo potenziale differenziativo ma allo stesso tempo non esistono cellule totipotenti e in grado di autorinnovamento illimitato.

La totipotenza è persa perché allo stadio della morula sono già presenti le basi del primissimo evento differenziativo in cui si forma la blastocisti che è evidente dal punto di vista morfologico come una sfera cava in cui all'interno c'è un piccolo gruppo di cellule da cui si origina il bambino e all'eterno c'è l'trofoblasto che prende contatto con la madre e che esprimeranno geni diversi causando differenziamento genico in cui non è possibile deviare verso l'altro destino differenziativo. Perdo stato di totipotenza.

Sono poi le cellule dell'EPIBLASTO che presentano la totipotenza.

Nell'uomo i saggi non possono essere fatti per etica però l'embrione umano può essere studiato fino alla blastocisti grazie alla fecondazione in vitro perché in alcuni paesi si possono utilizzare i

blastomeri in eccesso. Fino alla blastocisti ognuno dei blastomeri è stato in grado di formare una blastocisti individuale: ovviamente non si possono poi trapiantare in madri e vedere se nascono bambini identici.

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari