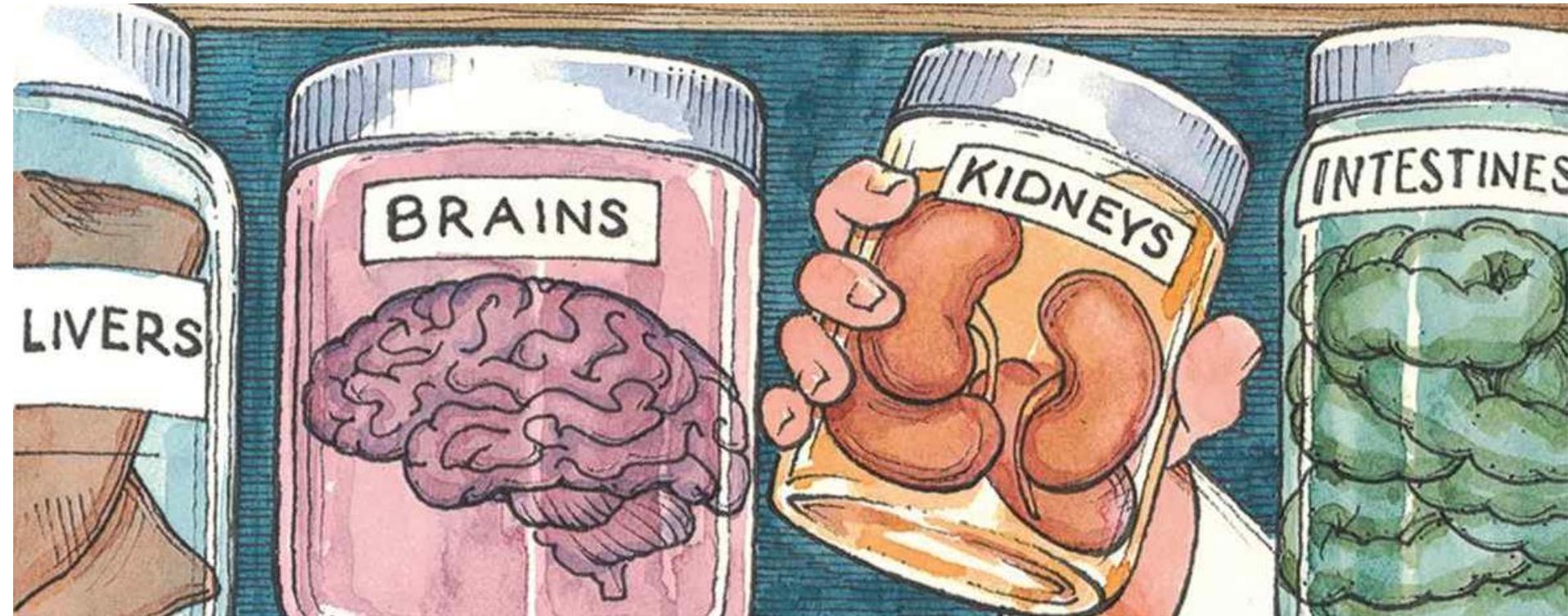


ORGANOIDI



Sabrina Ciancia
Vincenzo Costantino
Giada Ferrara

Mariangela Filosa
Giulia Mariotti
Luigi Truppa

“It doesn’t require any super-sophisticated bioengineering,” says Knoblich. “We just let the cells do what they want to do, and they make a brain.”

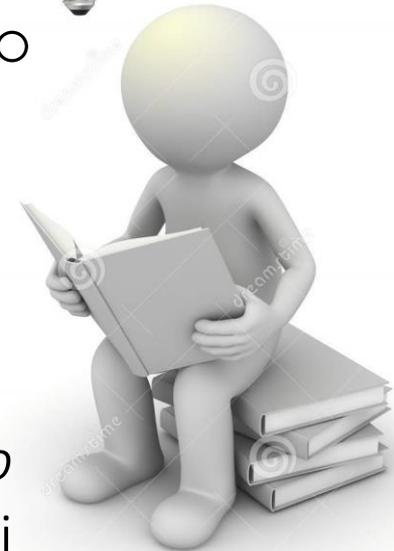
Gli organoidi

- Cosa sono?
- Un po' di storia...
- Come si generano?
- Tipi di organi 'in miniatura'
- Usi e applicazioni
- Limiti e sviluppi futuri

L'organoide è...

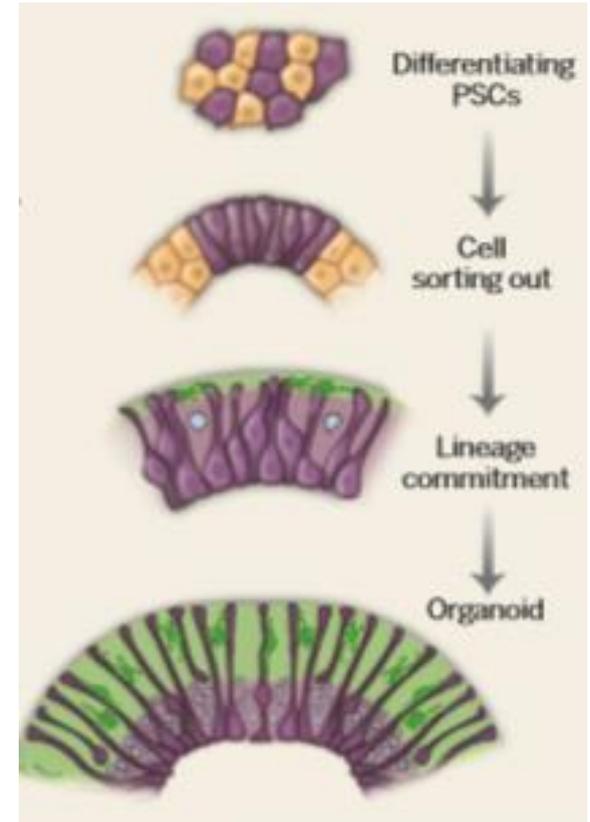
Organoide s.m. che riproduce la struttura generale di un organo.

L'organoide è un *cluster* cellulare 3D *in vitro* derivante da cellule staminali o da organi progenitori che spontaneamente si auto-organizzano spazialmente in modo simile alla controparte *in vivo*.



Caratteristiche

- Morfologia e funzioni dell'organo *in vivo*
- *Self-renewal*
- *Self-organization*
- Diversi tipi di cellule
- Crioconservazione (biobanche)
- Assenza di cellule mesenchimali, stromali e del sistema immunitario
- Assenza di innervazione e vascolarizzazione
- Dipendenza da matrici extracellulari artificiali per facilitare la self-organization



Storia degli organoidi (1)

Holtfreter conduce esperimenti di dissociazione-riaggregazione con pronefroni dissociati di anfibi

Pierce e Verney descrivono la differenziazione di embrioni in vitro

Evans preleva cellule staminali pluripotenti da embrioni di topi. Martin isola cellule staminali pluripotenti e conia il termine 'cellula staminale embrionale'.

1907

Wilson dimostra il potenziale di cellule 'spugnose' differenziate ad auto-organizzarsi per rigenerare un intero organismo

1944

Weiss and Taylor conducono esperimenti di dissociazione-riaggregazione con diversi organi da embrioni di pollo

1960

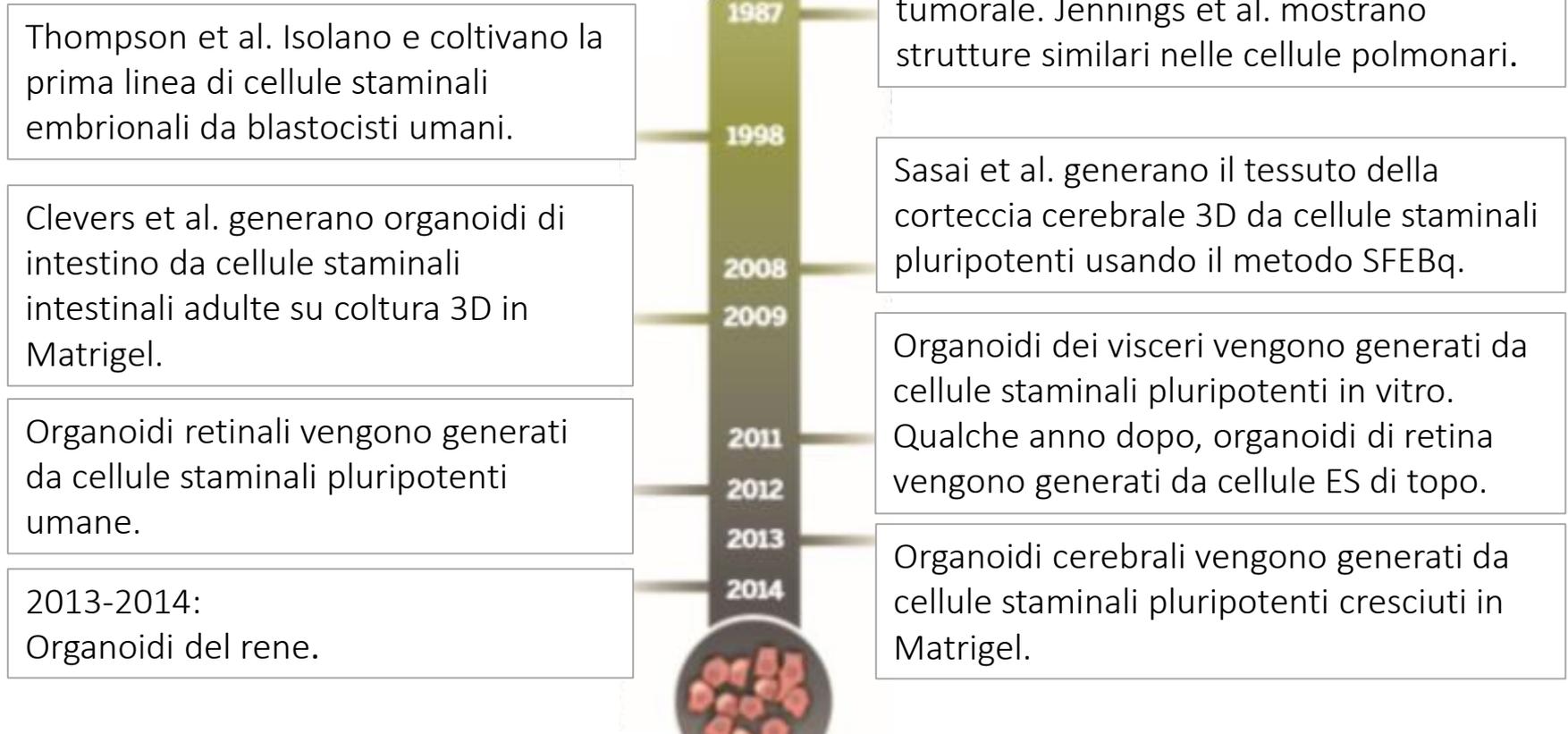
1961

Steinberg introduce l'ipotesi sull'adesione differenziale (DAH) dell'organizzazione delle cellule.

1964

1981

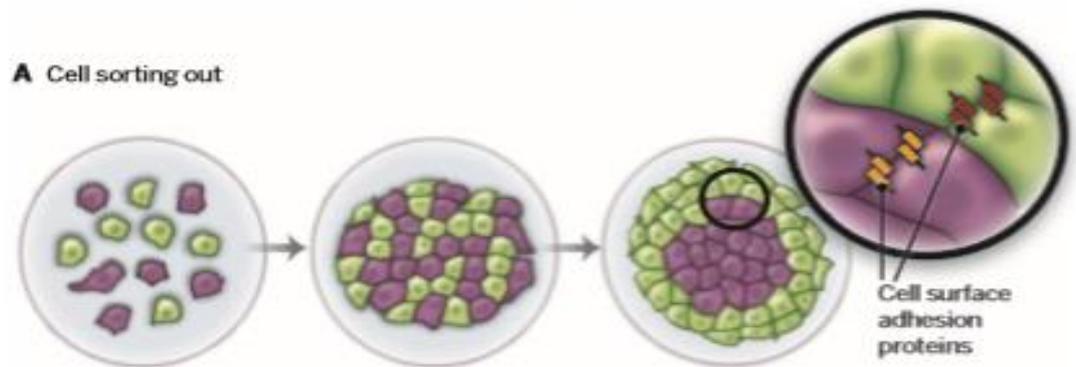
Storia degli organoidi (2)



Self-organization: le fondamenta della formazione dell'organoide

- 'Cell sorting out': capacità di riorganizzazione e segregazione delle cellule per formare strutture con proprietà istogeniche analoghe a quelle *in vivo*.

Di cellule con proprietà adesive simili in domini che raggiungono una configurazione termodinamicamente stabile (ipotesi dell'adesione differenziale di Steinberg, mediata da proteine adesive sulla superficie cellulare)

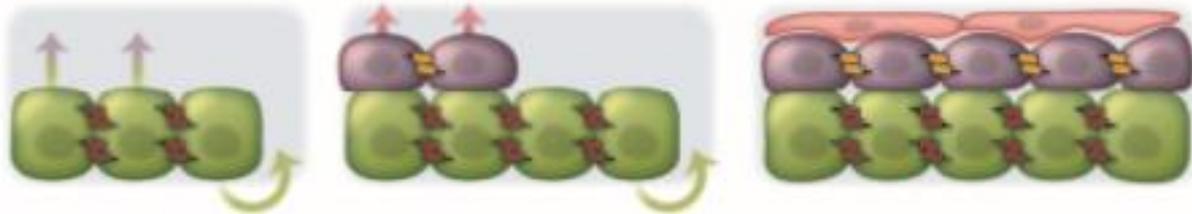


- *'Fate specification'*:
Morfogenesi spazialmente limitata guidata dalle cellule progenitrici che danno vita a cellule figlie più differenziate.
Limiti spaziali del tessuto e/o l'orientazione della divisione forzano le cellule figlie a posizionarsi più superficialmente per promuovere la loro differenziazione



Meccanismo di stratificazione iterativo

B Spatially restricted lineage commitment

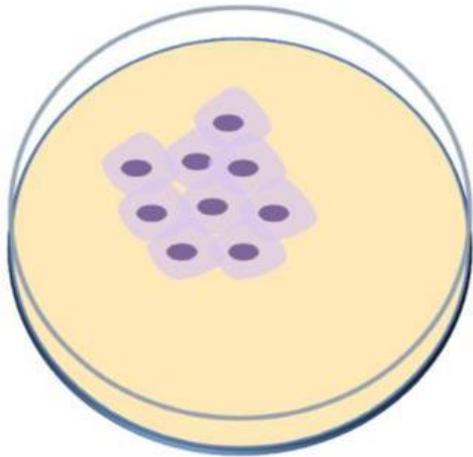


Partendo dal 2D...

L'isolamento di cellule staminali a lungo termine da tessuto non parenchimale e la successiva disposizione ordinata su scaffold 2D si effettuano utilizzando approcci densità-gradiente dipendenti.

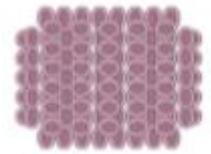
Pro:

- Facilità di realizzazione
- Basso costo



Contro:

- Difficoltà di mantenimento e alta mortalità cellulare
- Instabilità genetica
- Perdita architettura specifica del tessuto
- Mancanza interazioni cellula-cellula e cellula-ECM:
 - ✓ Perdita dei pathway di segnale e rappresentazione funzionale
 - ✓ Mancato mantenimento del fenotipo in situ



Monolayer cell culture



Spheroid



Organoid



Tissues are made of highly complex
3D arrangements of cells

...passando per gli sferoidi...

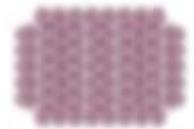
L'utilizzo di sferoidi uni-cellulari e multi-cellulari si è rivelato un sistema efficiente per ottimizzare e superare le limitazioni legate ai sistemi convenzionali in vitro.

Pro:

- Primo modello 3D
- Presenza di contatti cellula-cellula
- Modello usato per lo studio in vitro di tipologie neoplasiche

Contro:

- Comparsa di tessuto necrotico e/o ipossico per diametri superiori ai 400-500 μ m
- Limitata diffusione di ossigeno e nutrienti
- Accumulo di cataboliti e tossine nella zona centrale



Monolayer cell culture



Spheroid



Organoid

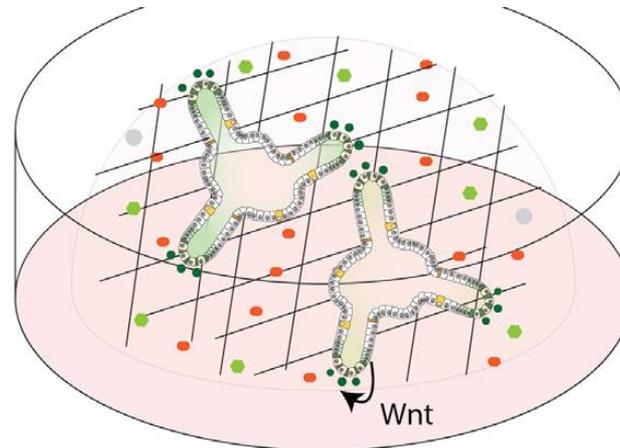
...fino agli organoidi.

Pro:

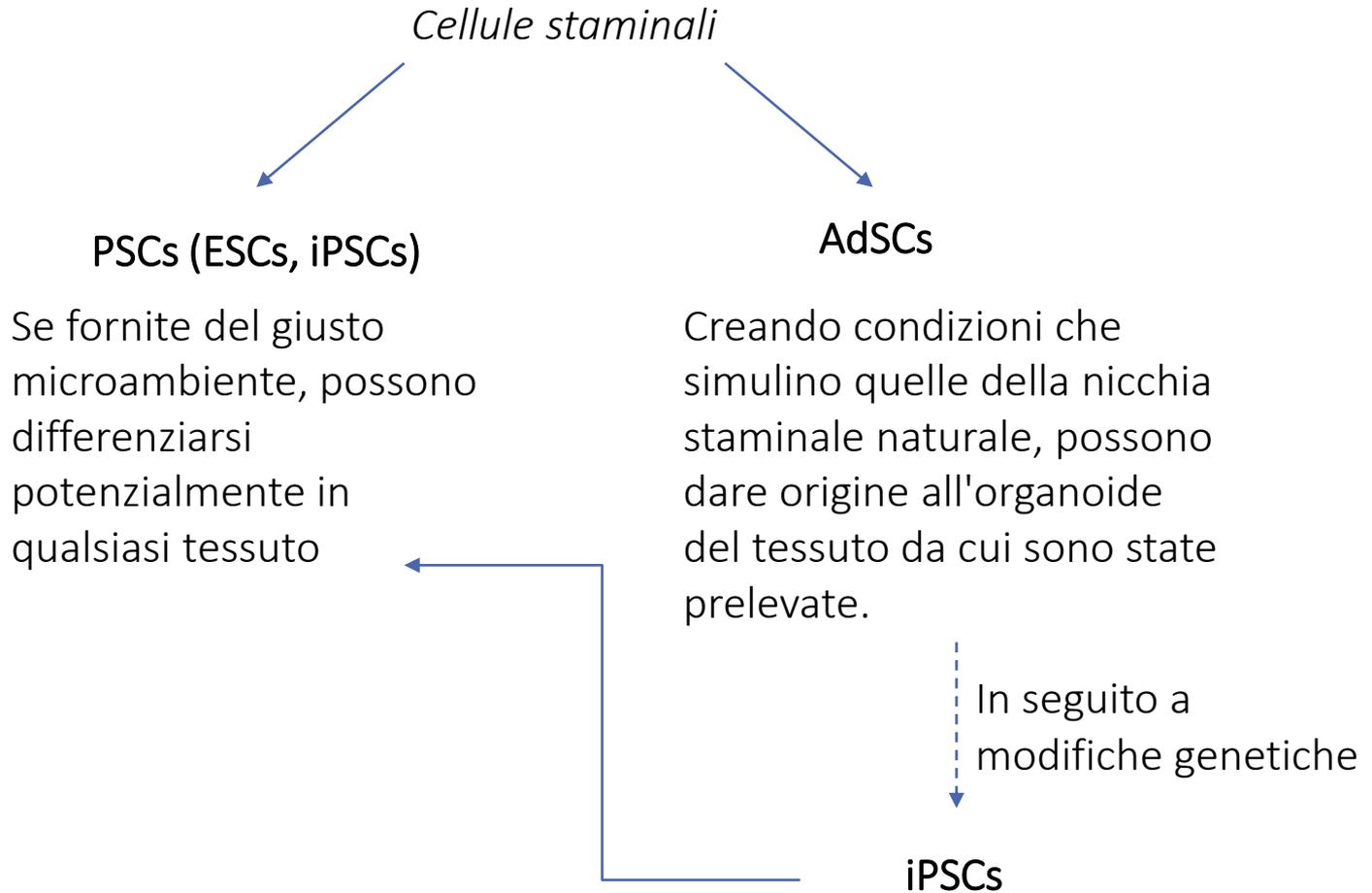
- Presenza di interazioni cellula-cellula e cellula-matrice
- Possibile controllo con manipolazione della nicchia o genome editing
- Possibilità di crioconservazione
- Stabilità genetica
- Organizzazione architetturale e mantenimento della funzione dell'organo
- Riproduzione della situazione *in vivo*

Contro:

- Difficili da realizzare
- Maggiore tempo di realizzazione
- Assenza di protocolli unificati

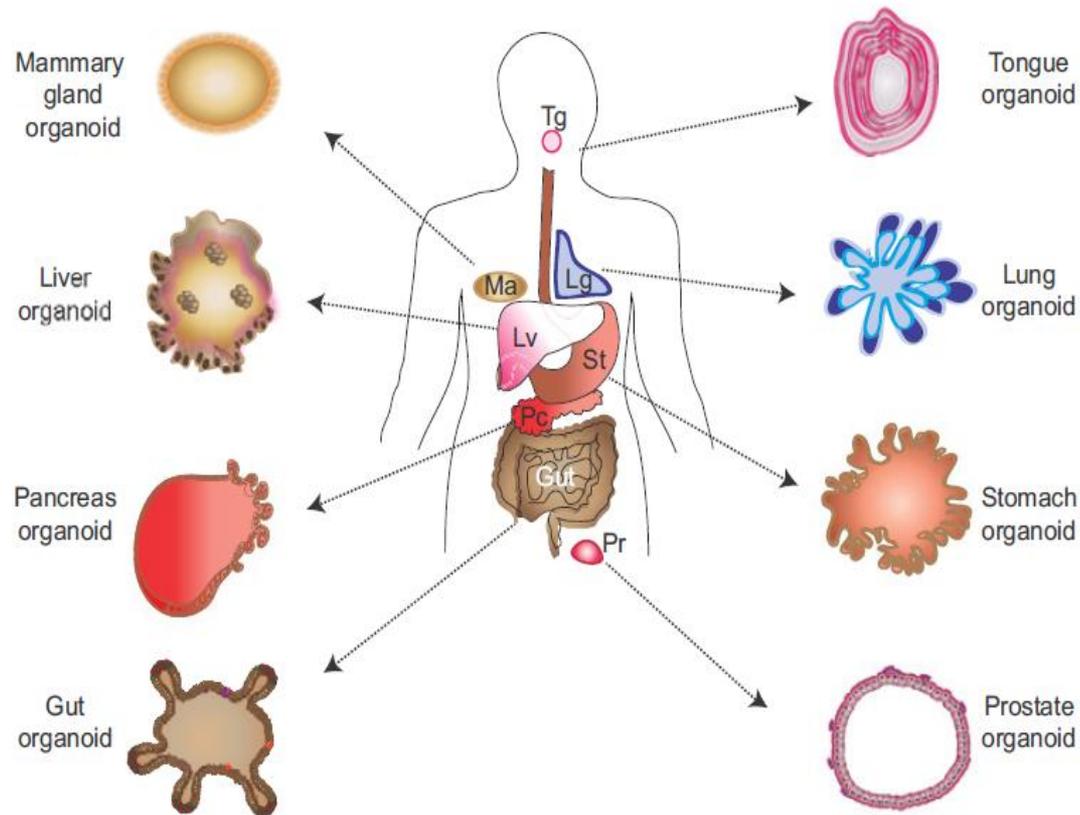


Generazione dell'organoide



AdSC (1)

Cellule **non differenziate** di organi o tessuti adulti, capaci di **autorigenerarsi** e di **differenziarsi** nei tipi cellulari del tessuto o organo preso in considerazione. Sono, quindi caratterizzate da uno stato di **multipotenza** (attività proliferativa e differenziativa ristretta).



AdSC (2)

Derivazione AdSC: sangue, pelle, muscolo, sistema nervoso, rene...

Tessuti primari adulti derivati da **organi endodermali** che ospitano cellule con la **potenza delle staminali** sono stati coltivati *in vitro* per generare organoidi.

Gli organoidi possono derivare da:

- Cellule staminali/progenitrici adulte
- Frammenti di tessuto dell'organo corrispondente

Le cellule in coltura si espandono a lungo termine mantenendo la loro stabilità genetica e l'organizzazione del loro tessuto di origine.

Prima osservazione: esperimenti sulla pelle (1980s)

Le cellule staminali dell'epidermide si accrescono e possono generare grandi quantità di epitelio *in vitro*.

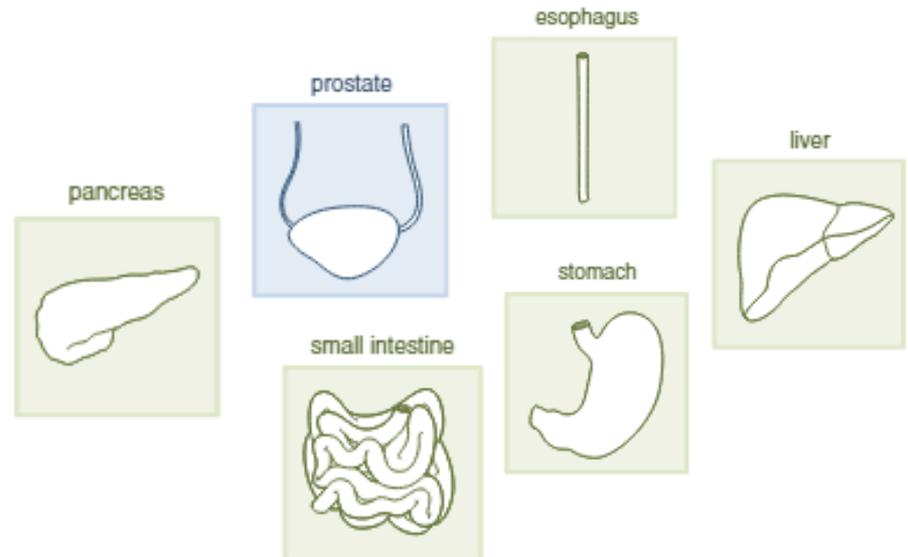
Esempi di organoidi da AdSC

Dal topo:

- Organoidi della lingua
- Organoidi delle ghiandole salivari
- Organoidi gastrici

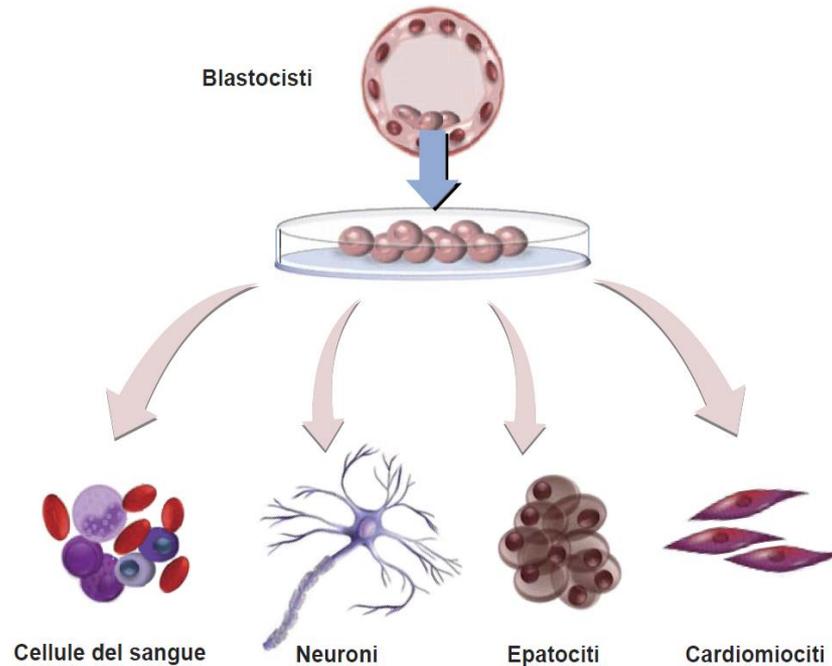
Dall'uomo:

- Organoidi del pancreas
- Organoidi della prostata
- Organoidi dell'esofago
- Organoidi dell'intestino
- Organoidi dello stomaco
- Organoidi del fegato



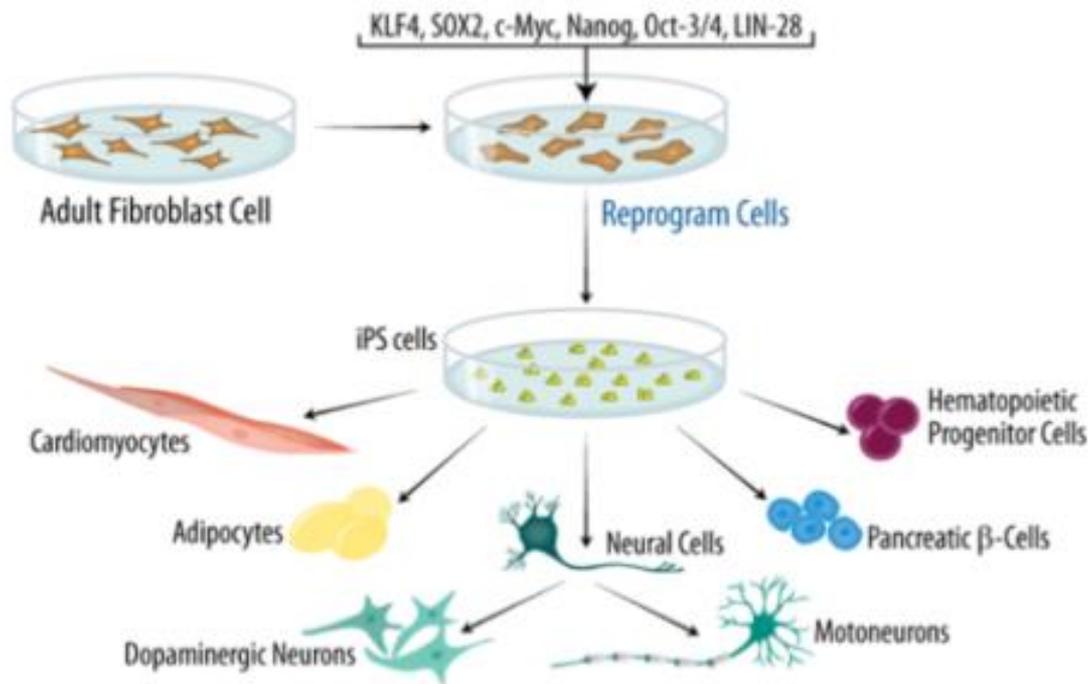
ESCs

Cellule **non differenziate** derivanti da embrioni (blastocisti), capaci di **automantenersi** (copiare se stesse) e di **differenziarsi** in più tipi cellulari specializzati. Sono, quindi caratterizzate da uno stato di **pluripotenza** (capacità di formare tutti i differenti tipi cellulari presenti nell'organismo).



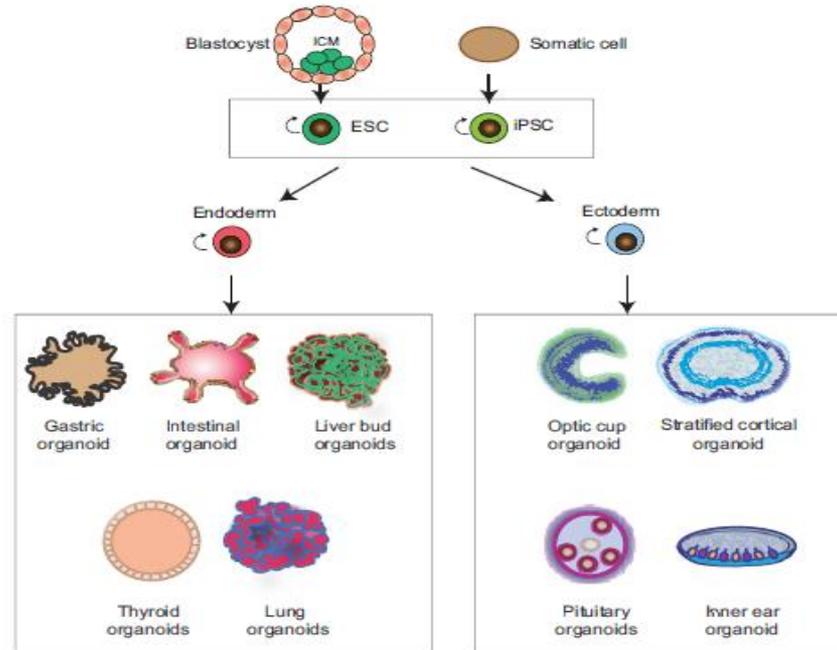
iPSCs

Cellule non pluripotenti, derivanti da cellule somatiche adulte, **ingegnerizzate** (indotte) per diventare **pluripotenti** (in grado di formare tutti tipi di cellule del corpo). Sono simili alle cellule staminali embrionali, ma non identiche. Infatti, le iPSC non danno problemi di rigetto (ottenute dal paziente stesso) e non sollevano problemi etici (l'embrione non viene danneggiato). Inoltre possono essere ottenute da cellule di ogni età.

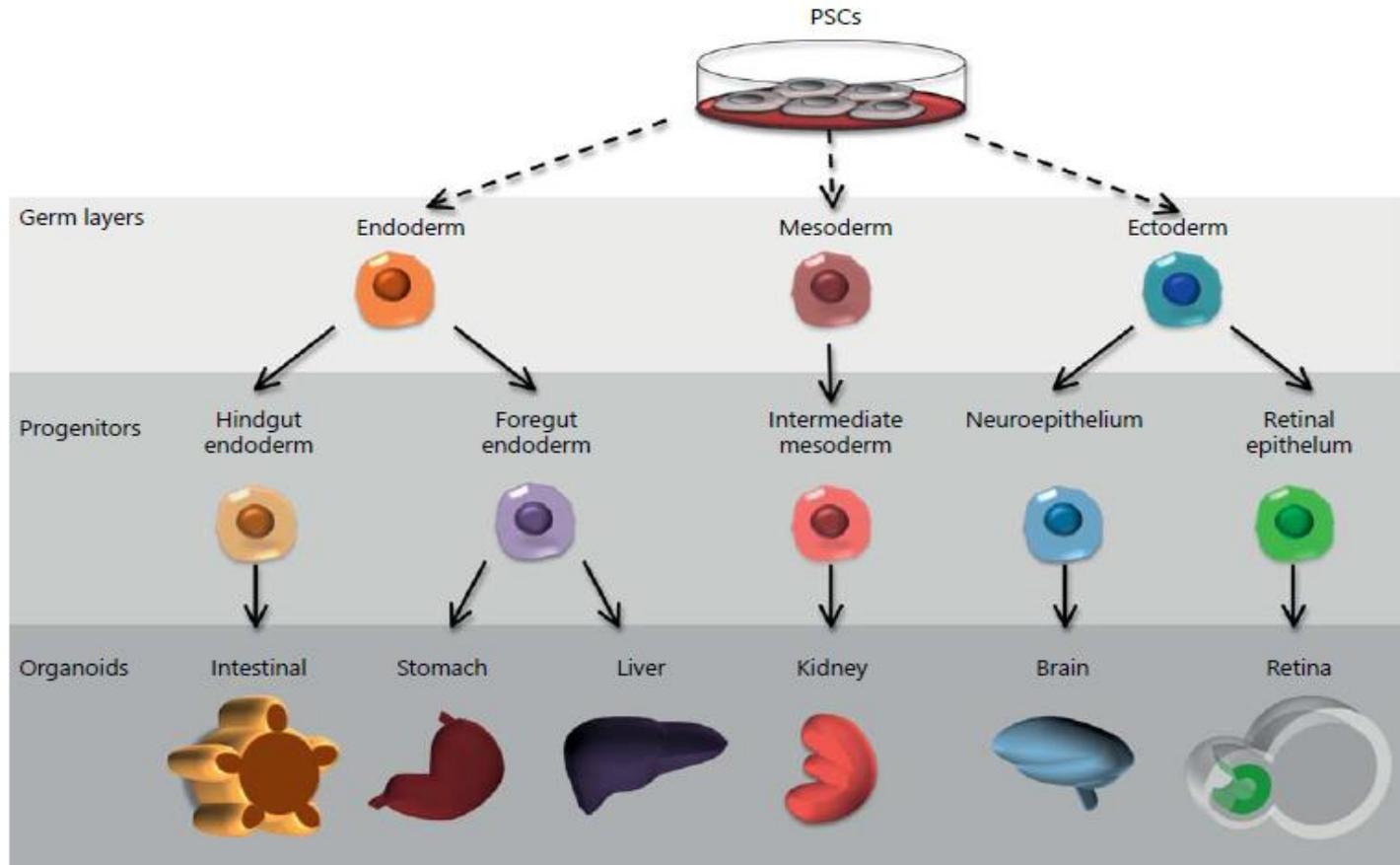


ESCs e iPSCs (1)

Le ESCs e le iPSCs possono essere derivate da diversi **strati germinali** (endoderma, mesoderma, ectoderma) *in vitro* seguendo specifici protocolli di differenziazione graduale. Dopo l'individuazione dello strato germinale, le cellule vengono trasferite in sistemi 3D e vengono generati gli organoidi che fedelmente riproducono *ex vivo* gli step evolutivi che si verificherebbero *in vivo*.

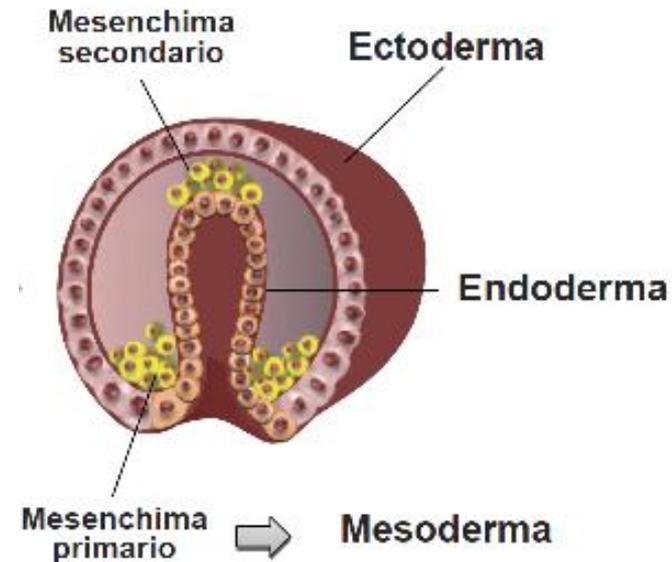


ESCs e iPSCs (2)



ESCs e iPSCs (3)

- Organoidi dall'**endoderma**:
nelle ESC e nelle iPSC viene stimolato il signaling del TGF- β (fattore di crescita trasformante) per formare l'endoderma definitivo, che poi differenzia nel corrispondente segmento di **visceri embrionali**.
- Organoidi dall'**ectoderma**:
le ESC e le iPSC sono indotte a formare aggregati simili ad un 'Embryoid body' (gruppi di cellule staminali pluripotenti) che sono poi guidate verso un destino **neurale o non-neurale** in seguito alla specificazioni ectodermica.
- Organoidi dal **mesoderma**:
organoidi del **rene** generati dalla modulazione dei 'signaling pathway' del FGF (fattore di crescita dei fibroblasti) e della GSK3 β (glicogeno sintasi chinasi 3) nelle iPSC umane, attraverso uno stadio intermedio mesodermico.

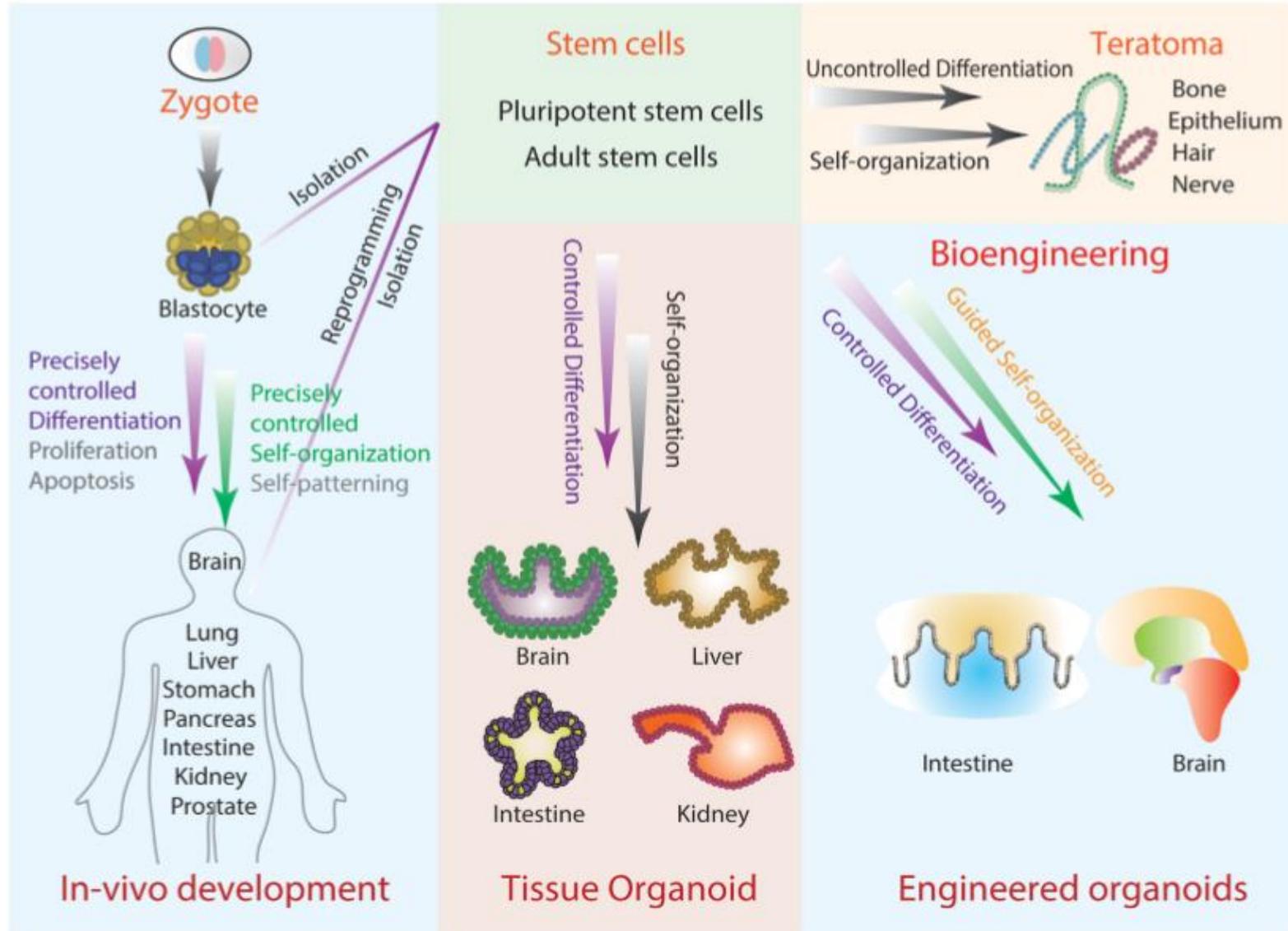


ESCs e iPSCs (4)

L'uso delle linee ESCs e iPSCs per generare organoidi:

- **Prevede:**
 - l'esposizione a fattori che promuovono il patterning dello strato germinale e del tessuto specifico;
 - l'integrazione nel Matrigel per facilitare lo sviluppo dell'architettura 3D;
 - trattamento con fattori di differenziazione per produrre gli organi voluti.
- **Permette:**
 - di superare la limitata disponibilità di materiale umano primario di alta qualità.
- **Necessita:**
 - di una conoscenza dettagliata dei fattori coinvolti nella specificazione dello strato germinale e della conseguente linea cellulare.

Le cellule staminali sono la materia prima per la formazione dell'organoide, ma essenziale è il controllo della differenziazione



Controllo della differenziazione cellulare

La differenziazione delle cellule staminali può essere controllata attraverso due metodi:

Diretto:

Porzioni di DNA inserite, eliminate o sostituite nel genoma della cellula tramite nucleasi (genome editing).

Eliminazione delle mutazioni monogeniche patologiche ereditarie.

Indiretto:

Controllo tramite manipolazione del microambiente:
segnali esogeni di natura enzimatica, meccanica e chimica.

A che scopo?

Le specifiche di progettazione della nicchia staminale dipendono dallo scopo dello studio:

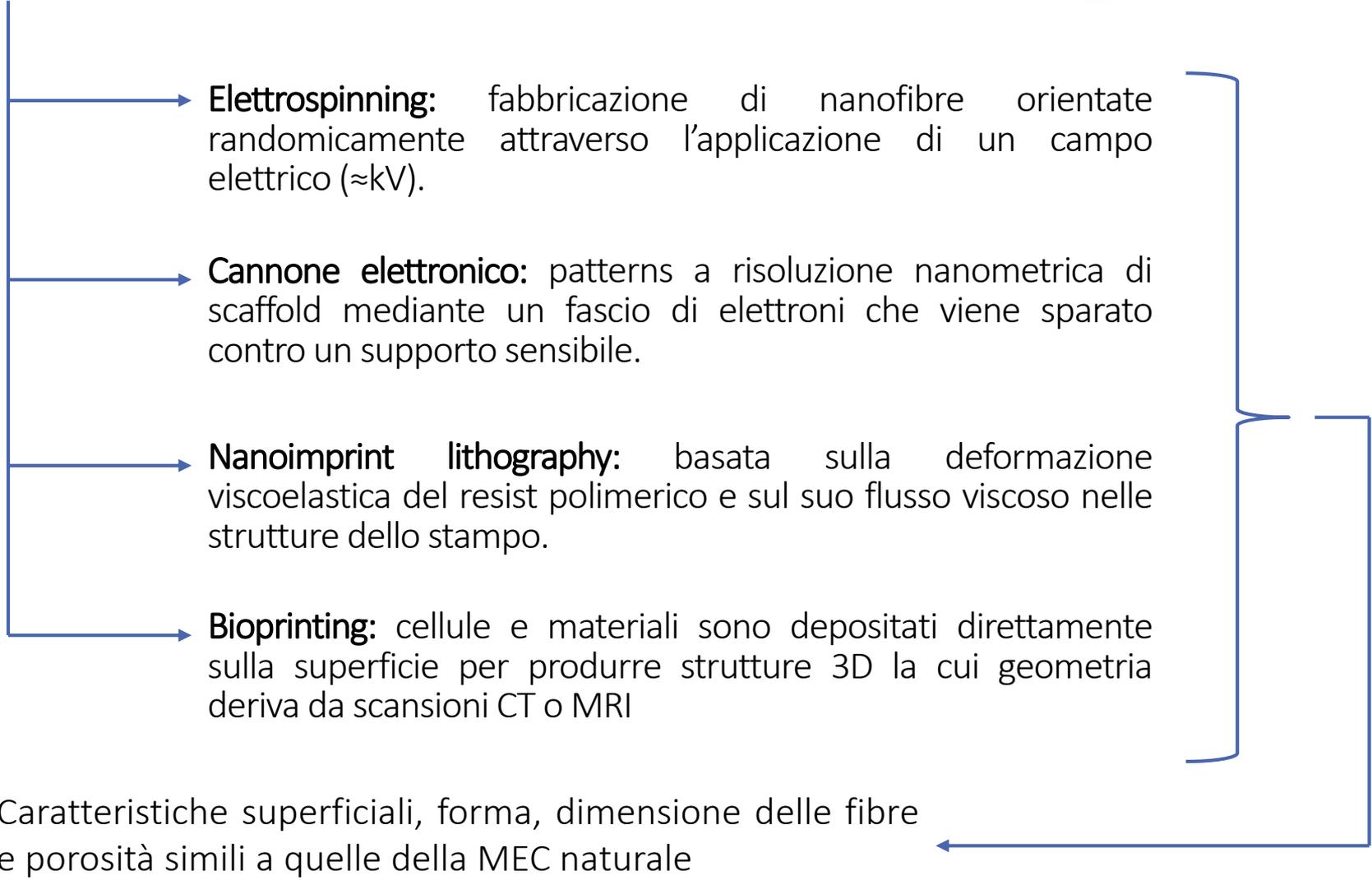
- **Espansione della coltura:** proteine di adesione (RGD) e fattori di crescita.
- **Test di farmaci:** sensori nanometrici che non influenzano l'ambiente dal punto di vista meccanico e fluidodinamico per la misurazione capillare delle variabili di interesse.
- **Trapianto dell'organoide:** lo scaffold deve essere tale da non traumatizzare le cellule quando rimosse dallo stesso.



Principali materiali utilizzati

- PEG, glicole polietilenico
- Polimeri termo-rispondenti
- PDMS
- **Matrigel**, miscela gelatinosa di proteine prodotte dalle cellule del sarcoma di un topo. Composizione eterogenea per stimolare il complesso comportamento cellulare:
 - ✓ Laminina
 - ✓ Entactina
 - ✓ Collagene
 - ✓ Fattori di crescita, che prevengono la differenziazione e promuovono la proliferazione
 - ✓ Altre proteine ignote (non riproducibilità esperimento)





Manipolazione della nicchia staminale

Stimolazione delle cellule

Segnali chimico/enzimatici:

Materiali bioadattabili:

- Coating con film proteico (RGD)
- Immobilizzazione di proteine sensibili alle reazioni enzimatiche della cellula in modo da modificare la matrice circostante.

Scaffold bioadattivo

Segnali meccanici:

Materiali fotosensibili:

- Immobilizzazione di fotoiniziatori → irrigidimento locale della matrice;
- Crosslink fotolabili → rilassamento locale della matrice

Creazione di gradienti di forze

Controllo spaziale e temporale

Colture 3D tradizionali: cellule «inondate» da terreno di coltura, nutrienti e fattori di crescita senza controllo spaziale o temporale .

Organoidi:

- i siti di legame biomolecolare sono incorporati nell'idrogel. I loro siti attivi vengono mascherati con materiali fotodegradabili → controllo luminoso;
- fattori di crescita solubili: immobilizzazione di nanoparticelle caricate con fattori di crescita → rilascio controllato;
- materiali biorispondenti: i fattori di crescita sono rilasciati in base alle metallo-proteinasi secrete dalle cellule;
- sistemi microfluidici per trasporto di ligandi che controllano il profilo e la velocità del flusso.

Vascularizzazione

- Semina di cellule endoteliali per lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni (neoangiogenesi) con aggiunta di:
 - Fattori di crescita vascolare endoteliale (VEGFs)
 - Fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGFFs)
 - Fattori di crescita di fibroblasti di base (BFGFs)
- Costruzione di micro-canali;
- Costruzione di vasi sanguigni posizionando opportunamente vari tipi di cellule vascolari (bio-printing).





 WARNING
HOT SURFACE

MakerBot

 NBC
LEARN

Rimozione delle cellule dallo scaffold

Uso di materiali termo-rispondenti:

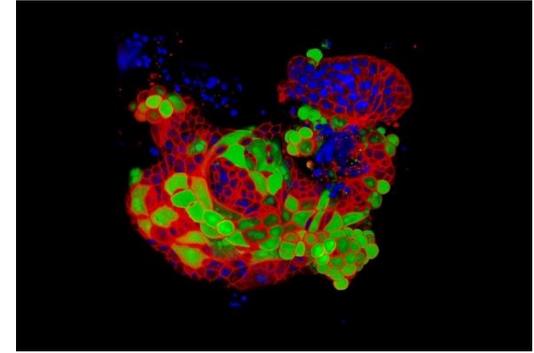
- Modifica della rigidità (teso-rilassato) in funzione della temperatura:
 - Nello stato teso il materiale diventa meno affine alle proteine, i legami cellule-superficie di adesione diventano più deboli ed è possibile rimuovere le stesse cellule dal substrato senza il lavaggio con sostanze potenzialmente dannose per la coltura.
- Modifica dello stato (liquido-solido) con la temperatura:
 - Allo stato solido lo scaffold incapsula le cellule, mentre nello stato liquido le rilascia.

Il pioniere degli organoidi: Hans Clevers



Ricercatore nel campo delle cellule staminali presso il Hubrecht Institute a Utrecht

Clevers Group: Lgr5 stem cells, Wnt signaling & cancer



Tcf as Wnt effector

1991: identificazione di un fattore di trascrizione per le cellule T (TCF), effettore della via **Wnt canonica**

pathway che porta alla trascrizione genica

Famiglia di proteine: fattori di crescita delle cellule staminali embrionali, di cui promuovono la capacità di rinnovarsi e mantenere uno stato pluripotente.

La via Wnt è fondamentale per il mantenimento delle cellule staminali in vivo.

subunità del complesso proteico della **caderina**

La **β -catenina** lega e attiva i TCF nucleari (in genere repressori trascrizionali) per la trascrizione, inducendo l'espressione dei geni target del signaling Wnt. In assenza di tali geni si nota che i TCF si legano a proteine che fungono da repressori trascrizionali.

Wnt signaling in cancer

La proteina APC (Adenomatous Polyposis Coli, soppressore tumorale) è il fulcro di un complesso citoplasmatico che lega la β -catenina e la marca per la sua degradazione nel proteosoma.

Nelle cellule del carcinoma del colon (APC-deficienti), la β -catenina si accumula e forma un complesso con il TCF4.

Effettore nucleare che attiva l'espressione genica quando legato alla β -catenina.

Wnt signaling in adult stem cells

Il Wnt signaling è coinvolto nella biologia delle AdSC e nel *self-renewal* dei tessuti.



Il malfunzionamento del gene TCF4 implica la soppressione delle cripte intestinali mentre quello del TCF1 disabilita il compartimento delle staminali nel timo.

Lgr5 as adult stem cell marker (1)

Tra i geni target della via Wnt emerge il gene Lgr5 che marca le cellule sul fondo delle cripte intestinali.

Lgr5:

cellule staminali tipiche dell'epitelio dell'intestino tenue e del colon.

Caratteristiche:

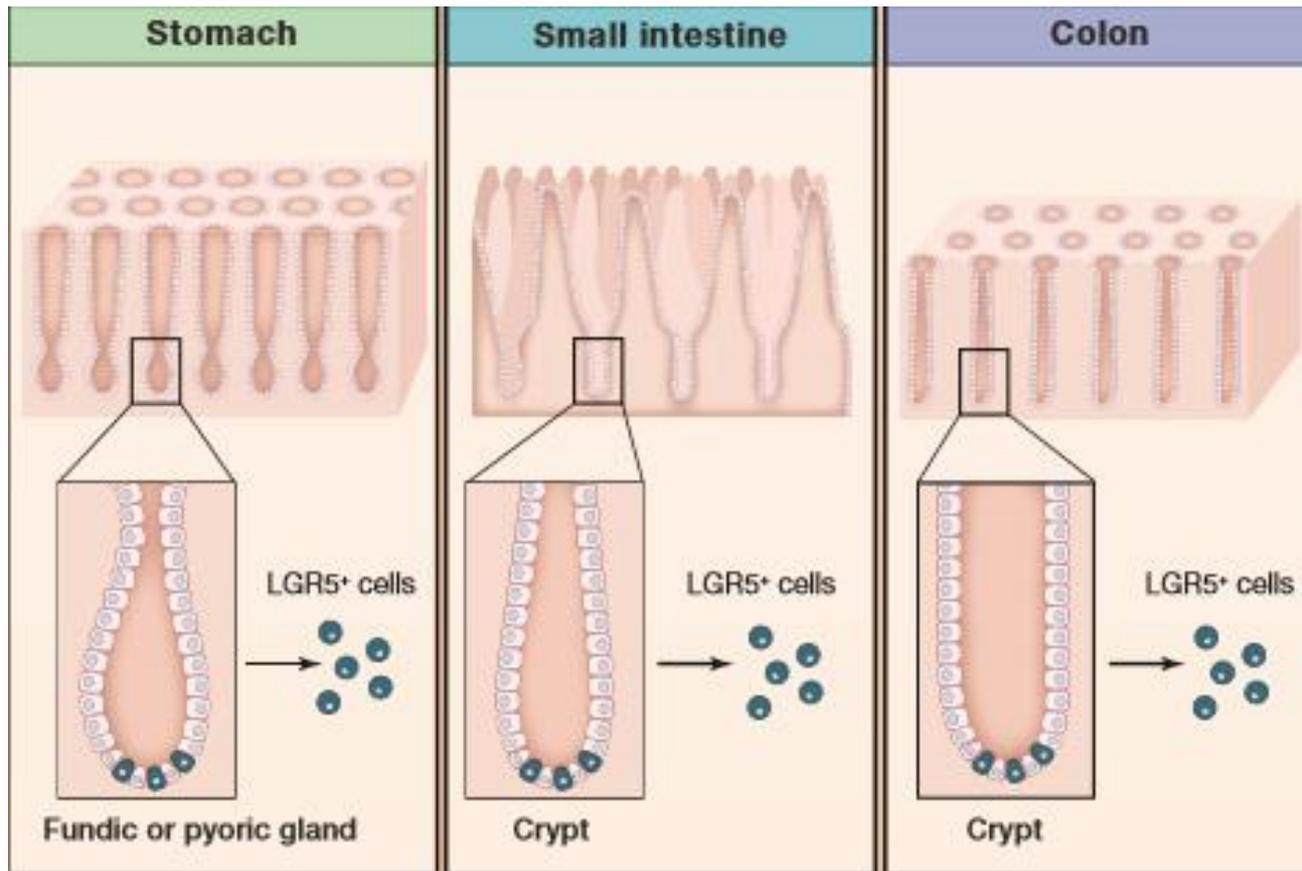
- ciclo cellulare veloce;
- divisione simmetrica e costante;
- in numero fisso in quanto competono in modo neutrale per lo spazio della nicchia;
- nell'intestino tenue le cellule figlie delle staminali (cellule di Paneth) fungono da cellule della nicchia nelle cripte fornendo segnali Wnt, Notch ed EGF.



fattore di crescita epiteliale che controlla la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule.

proteina transmembrana monopasso che interagisce con la proteina δ sulla membrana di un'altra cellula

Lgr5 as adult stem cell marker (2)



Il gene target dei segnali Wnt che codifica per il fattore di trascrizione Achaete scute-like 2 controlla il destino delle cellule staminali intestinali.

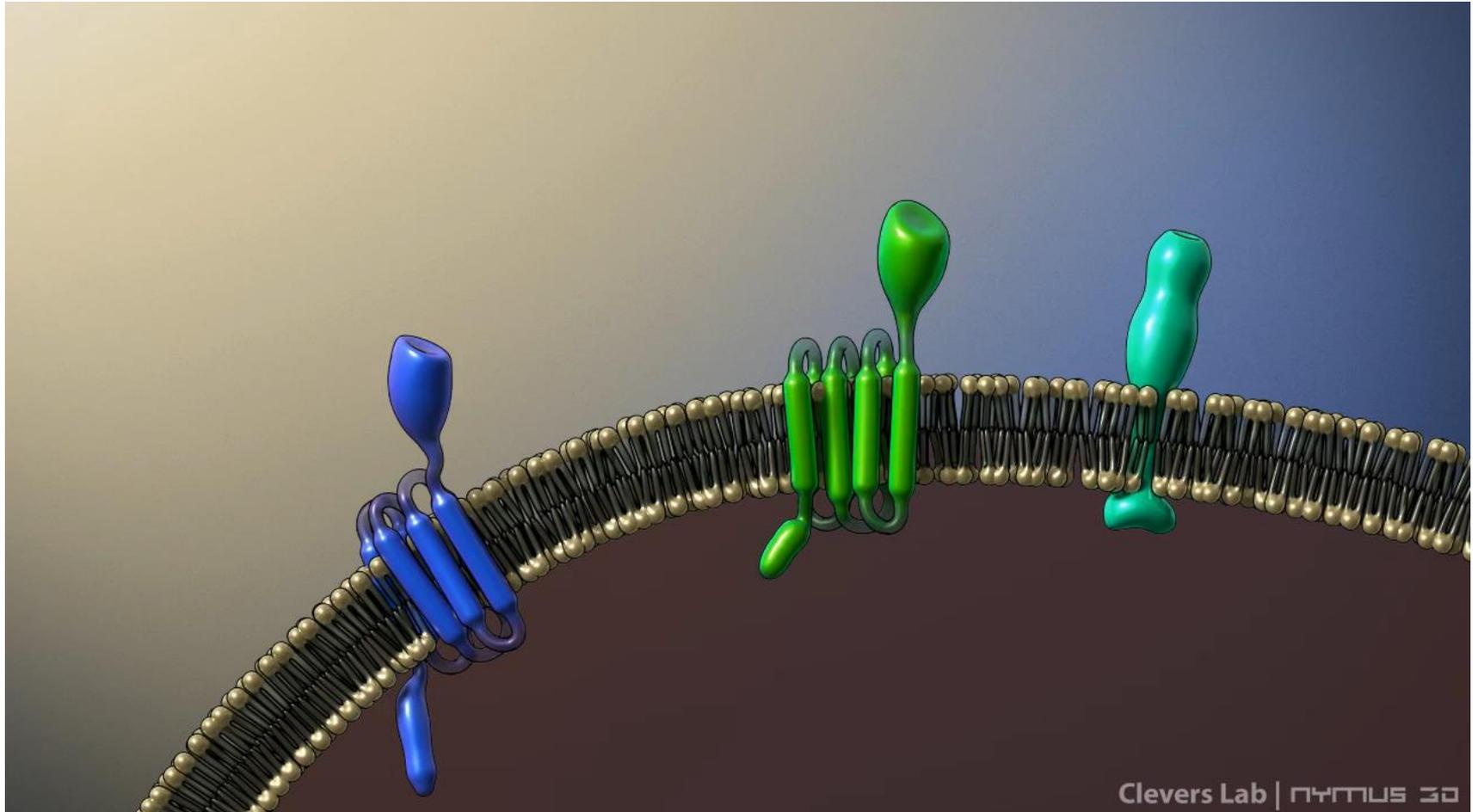
Lgr5 is the R-spondin receptor

Lgr5 (e i suoi omologhi Lgr4 e Lgr6) è un recettore per la **R-spondina**, potenziatore della via Wnt e fattore di crescita delle staminali. Il complesso Lgr5/R-spondina agisce neutralizzando Rnf43 e Znr3, due ligasi transmembrana che agiscono con meccanismo di feedback negativo nella via Wnt (causano la **downregulation**) per controllare le dimensioni dello spazio occupato dalle staminali.



La mancata espressione di essi causa iperreattività ai segnali Wnt endogeni. L'eliminazione di essi nell'epitelio intestinale induce la formazione di adenomi fatti interamente da cellule staminali Lgr5 e dalla loro nicchia.

Regulation of Wnt receptor availability on stem cells

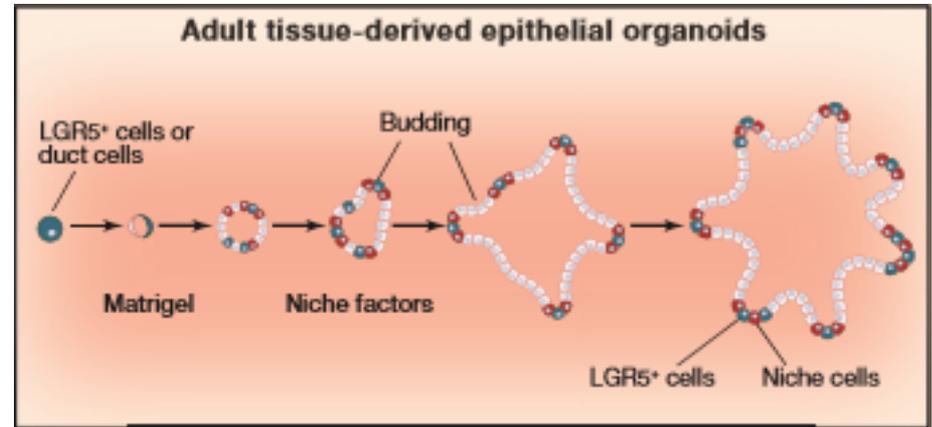


Long-term clonal culturing of organoids from Lgr5 stem cells

2009: Sistemi di coltura ben definiti e stabili basati su Lgr5/R-spondina permettono la proliferazione a lungo termine delle staminali e la conseguente formazione di 'mini-intestini', 'mini-stomaci', organoidi epatici e prostatici.

Il sistema: Matrigel addizionato con fattori di crescita che costituiscono i segnali chiave della nicchia:

- Wnt
- R-spondina per il mantenimento
- EGF per promuovere la proliferazione
- Noggin, inibitore della BMP



METODO R-SPONDINA

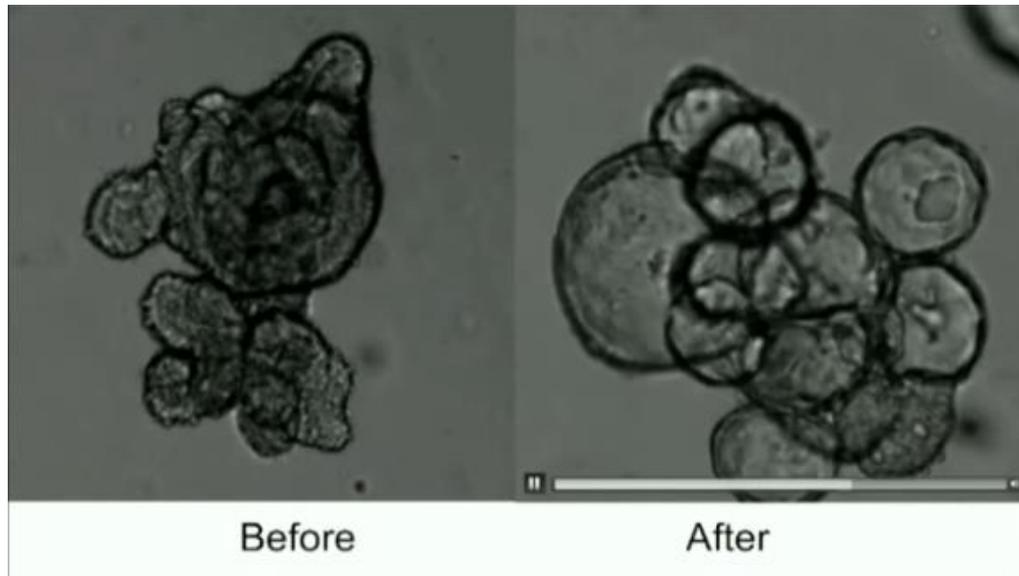


per la creazione di strutture 3D con domini distinti di cripte e villi contornanti un lume centrale contenente le cellule morte derivanti dal costante rinnovamento dello strato epiteliale.

Le colture di organoidi epiteliali molto stabili geneticamente e fenotipicamente, permettono il trapianto di cellule figlie derivanti da un'unica staminale e la modellazione di patologie a partire da organoidi formati da tessuti malati.

Esempio

La mutazione del gene CFTR (Regolatore Transmembrana della Fibrosi Cistica) è stata riparata a partire da cellule staminali singole intestinali derivanti da due pazienti con fibrosi cistica. Le cellule staminali sono state coltivate in modo clonale formando mini-intestini contenenti un canale CFTR funzionale.





Altri organoidi

Type of tissue	Source	Stem cell culture condition (niche factors)	Differentiation culture condition
Stomach	Adult mouse	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, FGF10	EGF, R-spondin
	Adult human	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, FGF10	EGF, R-spondin
	hPSC	EGF	EGF
Small intestine	Adult mouse	EGF, Noggin, R-spondin	EGF, Noggin, R-spondin
	Adult human	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A TGF-b inhibitor, p38 inhibitor	EGF, Noggin, R-spondin, TGF-b inhibitor
	hPSC	EGF	EGF
Colon	Adult mouse	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A	EGF, Noggin, R-spondin
	Adult human	EGF, Noggin, R-Spondin, Wnt-3A, TGF-b inhibitor, p38 inhibitor	EGF, Noggin, R-spondin, TGF-b inhibitor
Pancreas	Adult mouse	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, FGF10, Nicotinamide	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A
	Adult human	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, FGF10, TGF-b inhibition, Nicotinamide	Not reported
Liver	Adult mouse	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, FGF10, HGF, Nicotinamide	EGF, Noggin, FGF10, TGF-b inhibition, Notch inhibition
	Adult human	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, FGF10, HGF, Nicotinamide, TGF-b inhibitor, Forskolin	EGF, Noggin, FGF10, TGF-b inhibition, Notch inhibition, BMP7

In presenza di combinazioni specifiche di fattori derivanti dalla nicchia, tessuti epiteliali umani e del topo prelevati da stomaco, intestino tenue, colon, pancreas e dotti biliari epatici formano in modo efficiente organoidi.

Mini-stomach

James Wells: uso di cellule staminali embrionali, più efficienti delle adulte usate da Clevers essendo pluripotenti.



mini organi più complessi



Difficoltà

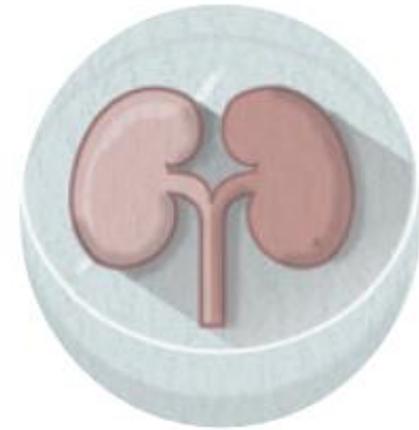
lo stomaco contiene strutture per la secrezione di acidi ed ormoni utili alla digestione.

Agendo per tentativi, utilizzando diverse combinazioni di fattori di crescita, viene creato l'antro pilorico senza però includere i fattori che regolano la secrezione di acidi.

Mini-kidney

Rene nell'adulto:

contiene circa 25/30 tipi di cellule. I costituenti principali sono i nefroni, che filtrano il sangue per produrre urina, e l'interstizio che include un'intricata rete di vasi e dotti.



2010: Melissa Little prova a trasformare le cellule staminali embrionali in cellule progenitrici dei nefroni. Dopo 3 anni di diverse combinazioni di fattori di crescita osserva due tipi di cellule che si modellano spontaneamente: progenitori dei nefroni e cellule originarie dei dotti.

Next challenge:

creare un mini-rene con vascolarizzazione ed interstizio per trapianti e test per la tossicità dei farmaci

Ma...

Assenza del sistema immunitario!!!

Mini-liver

Le cellule epatiche sono difficili da coltivare



Takebe lavora con cellule iPS in unione ai precursori delle cellule epatiche in formazione (epatoblasti).

Un mix di epatoblasti e cellule mesenchimali ed endoteliali ha portato alla formazione di strutture liver-like in 6 settimane con dimensioni di una lenticchia.



L'idea: introduzione di migliaia di 'liver bud' in un fegato danneggiato al fine di recuperare le funzioni evitando il trapianto.

La prova: su topi con il risultato di uno sviluppo in cellule epatiche mature capaci di produrre proteine specifiche e metabolizzare i farmaci.

L'obiettivo: iniezione di grandi quantità di gemme epatiche (organoidi) nella vena porta che irrorà il fegato.

Ma Smith...



«It's like running before you can walk».

Mini-brain (1): la scoperta di Madeline Lancaster

Lancaster (2011): per settimane prova a generare, da cellule staminali embrionali, cluster di cellule capaci di diventare diversi tipi di neuroni: neural rosettes.

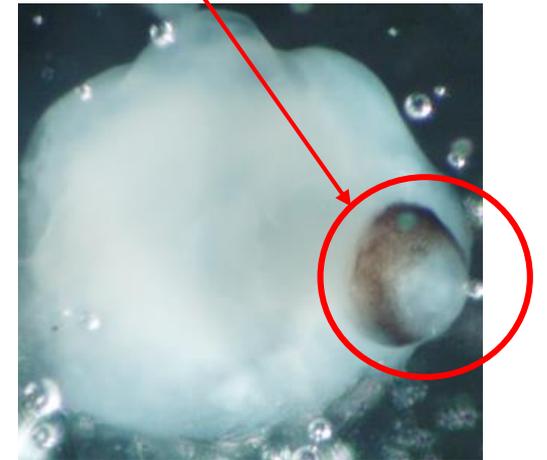


Le cellule non si attaccano sul fondo del piatto di coltura ma galleggiano formando strane e lattiginose sfere. Si osserva uno strano pigmento.

Al microscopio: il pigmento è un insieme di cellule scure della retina in formazione, conseguenza di un cervello in sviluppo.

Dal sezionamento risultano una grande varietà di neuroni.

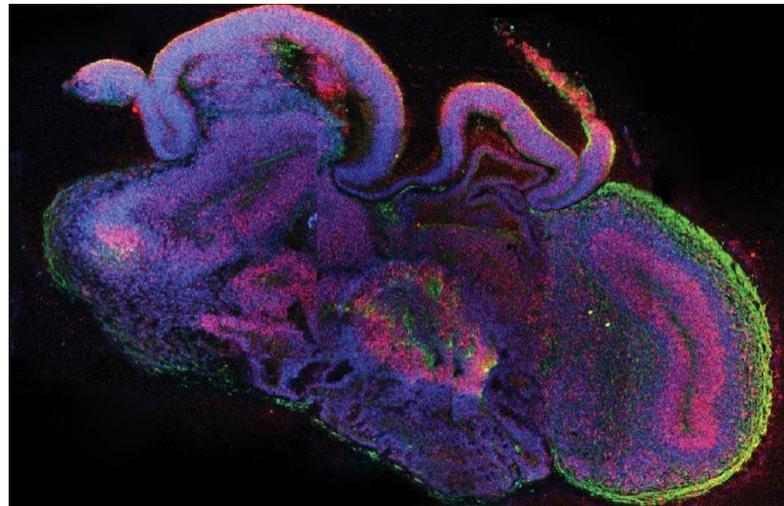
Conclusione: l'assemblaggio delle cellule ricalca un cervello embrionale.



Mini-brain (2)

Sasai(2008-Giappone): induzione di cellule staminali embrionali di topo e umane a formare strati di cellule sferiche somiglianti alla corteccia cerebrale.

Lancaster(2011): realizzazione di organoidi neurali eterogenei che contengono diverse regioni del cervello ma tra loro interdipendenti.



Sezione di un organoide cerebrale: cellule staminali neurali in rosso e neuroni in verde.

Mini-brain (3): l'attività di ricerca di M. Lancaster

Uno sguardo alla ricerca

Generazione di tessuto cerebrale da cellule staminali embrionali umane o da cellule iPS riprogrammate al fine di modellare lo sviluppo e le malattie del cervello.

L'interesse di Madeline

Modello per osservare i processi di sviluppo del cervello umano, necessario nel campo della neurobiologia.

Dalle PSC a cervelli in miniatura

1. Pochi segnali alle PSC per provare a farle diventare cellule neurali.
2. Ambiente adatto alle PSC per permettere lo sviluppo delle PSC in modo autonomo usando i loro segnali endogeni verso le diverse regioni cerebrali.



Mini-brain (4): l'attività di ricerca di M. Lancaster

Prime osservazioni

- Gruppi bianchi di cellule sconosciuti. Un organoide presenta un'area pigmentata scura dalla forma circolare somigliante al tessuto dell'occhio: l'epitelio pigmentato della retina in formazione.
- Regioni differenti: retina, ippocampo, plesso coroideo (origine del fluido cerebrospinale), tessuti del prosencefalo ventrale e i contorni del mesencefalo e del rombencefalo.
- Interazione tra diverse regioni (tutte incluse nello stesso tessuto nell'organoide). Ad esempio, i neuroni prodotti nel prosencefalo ventrale migrano nella parte dorsale come fanno in vivo.

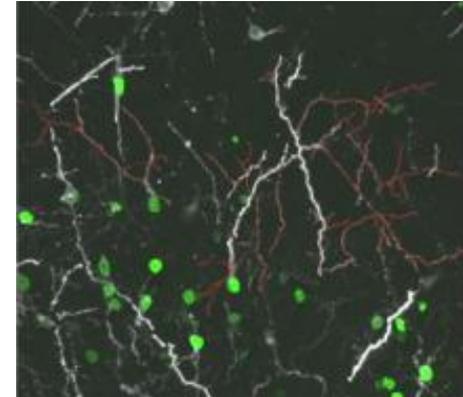


«So even over millimetres of distance, these cells automatically know where to go. They know to go from the ventral to the dorsal region and they don't require any exogenous factors to do that.»

Mini-brain (5): l'attività di ricerca di M. Lancaster

I neuroni

Presenti in gran numero negli organoidi. Nella corteccia cerebrale dorsale sembrano essere funzionali: si 'accendono', manifestano crescite spontanee di calcio e 'axon guidance' in un modo che assomiglia all'impacchettamento assonico *in vivo*, sanno dove inviare i loro assoni senza fattori esogeni.

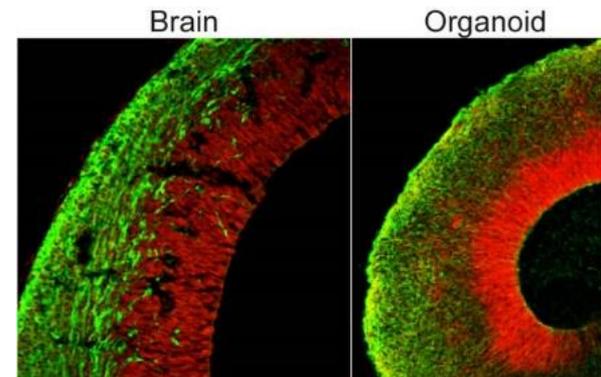


Encefalo allo stadio iniziale

L'organoide è un cervello molto primitivo che ricalca quello *in vivo* fino al primo trimestre di vita embrionale. Le diverse regioni interagiscono ma non sono organizzate nella maniera stereotipica: non ci sono assi (antero-posteriore o ventro-dorsale).



Questi organoidi non sanno 'pensare' né sono funzionali probabilmente, ma si possono studiare le regioni singolarmente.



Mini-brain (6): l'attività di ricerca di M. Lancaster

La novità

Le regioni cerebrali individuate sono incluse in un unico organoide. Precedentemente ricercatori hanno creato regioni isolate del cervello da cellule staminali neurali.

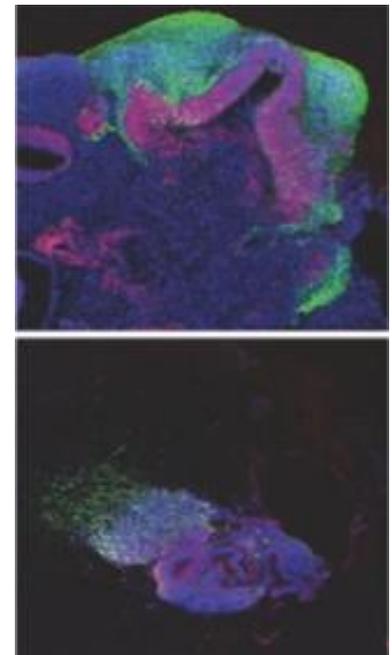


Le diverse regioni insieme e le loro interazioni permettono di avere tessuti più complessi e che possono svilupparsi ulteriormente.

Le applicazioni e gli scopi

Osservazione della biologia dell'encefalo nonché delle malattie come la microcefalia (difficilmente modellabile nei topi).

Attraverso la coltivazione di iPSC riprogrammate a partire da cellule di pazienti con microcefalia si sono ottenuti organoidi in cui si osserva che i tessuti sono molto più piccoli del controllo. Ciò deriva dalla differenziazione precoce delle staminali neurali per cui il paziente dispone di meno PSC che possono dare origine a meno neuroni.



Mini-brain (7): l'attività di ricerca di M. Lancaster

Conclusioni

I mini-brain:

- mancano di molte caratteristiche del cervello animale: vascolarizzazione (assente anche nelle prime fasi dello sviluppo embrionale), reti neurali;
- non possono fare da modello delle funzioni complesse del cervello e dei difetti neurologici che si sviluppano più avanti;
- non permettono di osservare processi in singole cellule e di riprodurre il funzionamento del cervello nel suo insieme: c'è bisogno ancora del modello animale;
- sono carenti di caratteristiche necessarie per i test farmacologici: non è presente la barriera ematoencefalica.

Valido complemento agli studi animali con conseguente riduzione della sperimentazione in vivo ma non ancora sostituto effettivo.

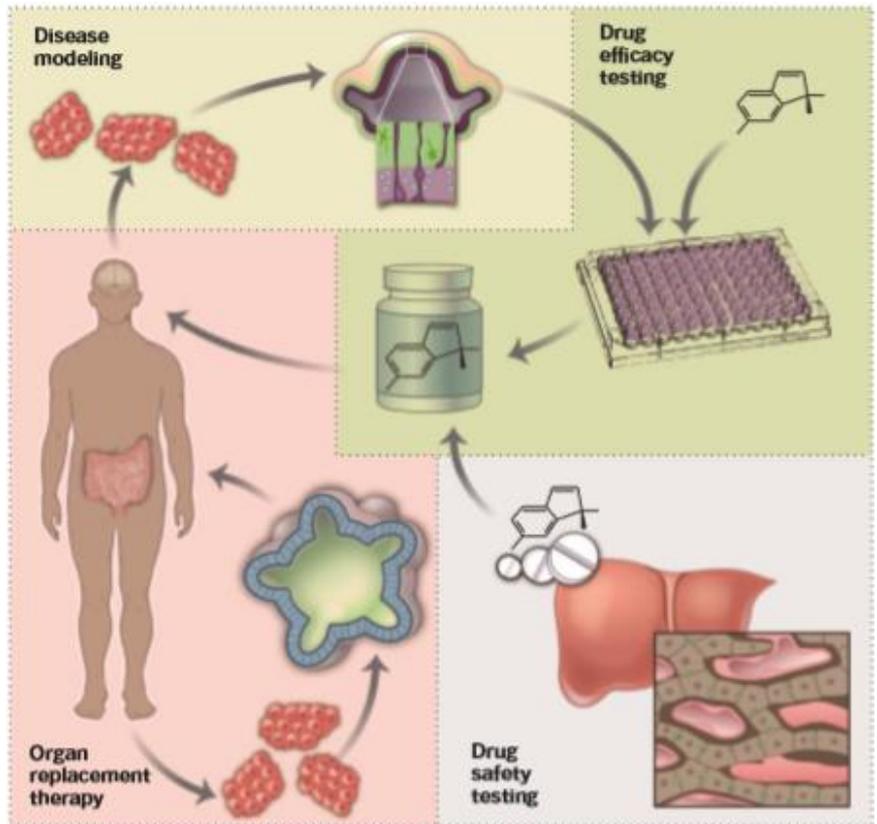
“This is game-changing science – the first description of a 3D model of the developing human brain, and the first time such a system has been used to study a human neurological condition. The implications for minimizing animal use as well as benefiting patients are enormous”.

Usi e applicazioni

Rappresentando gli organoidi un modello facilmente accessibile, essi hanno la potenzialità di rispondere a domande finora irrisolte. Questo risulta particolarmente vero per l'uomo.

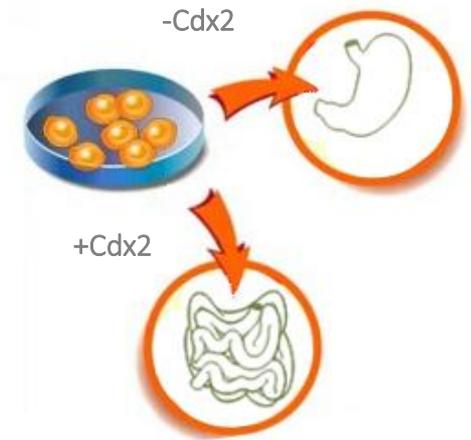
Essi trovano impiego in:

- Studio del meccanismo regolatorio dell'organogenesi
- Modelizzazione dei disturbi umani
 - Malattie infettive
 - Malattie ereditarie
 - Neoplasie
- Test di tossicità ed efficacia farmacologica
- Medicina personalizzata
- Medicina rigenerativa
- Ingegneria genetica



1. Studio del meccanismo regolatorio dell'organogenesi

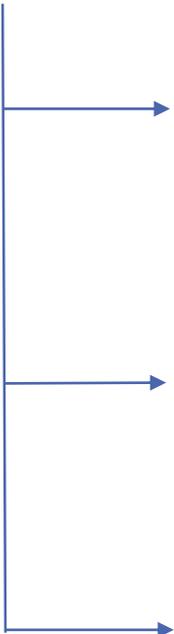
- Nei tessuti adulti sani la transdifferenziazione tra tessuti di tipo diverso non avviene spontaneamente o per semplici cambiamenti ambientali e i tessuti risultano resistenti al cambiamento di linea cellulare. A tal proposito un organoide di tessuto intestinale adulto può diventare stomaco a causa della mancanza di un solo fattore di regolazione **Cdx2**.
- Al contrario, nel caso di organoidi derivati da human pluripotent stem cells (hPSCs) il destino dell'organoide di differenziarsi in intestino o in stomaco è regolato da un gruppo di fattori di crescita chiamati bone morphogenetic proteins (**BMPs**), che intervengono a monte della differenziazione vera e propria.



Le colture di organoidi umani permettono di studiare il meccanismo regolatorio alla base dello sviluppo dell'organo dallo stadio embrionale a quello adulto, attraverso l'analisi dei vari stadi di differenziazione.

2. Modellizzazione dei disturbi umani(1)

➤ Malattie infettive:



La generazione di organoidi del polmone da iPS di un bambino affetto da un'**influenza** potenzialmente letale, dovuta a una mutazione del gene 7 che codifica per gli interferoni, ha mostrato una ridotta produzione di interferoni e un conseguente aumento del virus influenzale.

Gli organoidi dello stomaco prodotti da iPSC e da AdSC possono essere efficacemente infettati da *Helicobacter pylori*.

Modellizzazione della microcefalia associata allo **Zika virus**: generazione di organoidi del prosencefalo da hPSCs che replicavano le caratteristiche morfologiche e funzionali della controparte *in vivo*; l'infezione con Zika virus riguarda principalmente i progenitori neuronali e comporta la morte cellulare, una diminuzione della proliferazione e una riduzione del volume della superficie cellulare.

2. Modelizzazione dei disturbi umani(2)

➤ Malattie ereditarie:

Fibrosi cistica (CF), malattia genetica autosomica recessiva causata da una mutazione del gene CF codificante per il CFTR (proteina canale per il cloro). Provoca un'anomalia nell'escrezione del cloro; viene secreto muco molto denso e viscoso che ostruisce i dotti principali. Il **fattore CFTR** è assente negli organoidi del polmone iPS-derived di pazienti affetti da CF, ma può essere reintrodotta tramite trattamento con piccole molecole che correggono alcune delle più comuni mutazioni della CF.

2. Modellizzazione dei disturbi umani(3)

➤ Malattie ereditarie:

Organoidi del fegato a lungo termine per capire la patofisiologia e la progressione da **NAFLD** (nonalcoholic fatty liver disease) a **NASH** (nonalcoholic steatohepatitis).

Fattori di rischio NAFLD: obesità, dislipidemia, ipertensione, insulino resistenza, diabete mellito di tipo 2.

Fattori di rischio NASH: cirrosi epatica ed eventuale tumore.

Indagini dirette sugli organoidi derivati dai pazienti riguardo:

- regolazione epatica del metabolismo dei lipidi;
- insulino resistenza;
- rilascio di citochine infiammatorie.

Più in generale, ha permesso di trovare una relazione di causa-effetto della patologia, al contrario dei modelli animali nei quali non è riscontrabile la NASH.

2. Modellizzazione dei disturbi umani(4)

➤ Neoplasie:

La possibilità di riprodurre organoidi affetti da cancro rappresenta un'opportunità unica per test funzionali come la sensibilità ai farmaci e per la correlazione di dati con il make-up genetico di singoli tumori. Il cancro può essere anche modellato in organoidi a partire da cellule staminali non mutate.

Esempi:

1. è stato osservato il potenziale metastatico in **organoidi dello stomaco** in assenza di TGFBR2 (gene codificante fattori di crescita).
2. è stata indotta **una combinazione di mutazioni nel colon** di un topo sano ed è stata osservato un progressivo sviluppo di un adenocarcinoma invasivo simile a quello osservato *in vivo*.
3. in precoci **organoidi pancreatici** hPSC-derived l'espressione dei **geni mutanti** KRAS e/o TP53 induce una strutture anomala dei dotti e una morfologia nucleare consistente con la trasformazione neoplasica in coltura e *in vivo*.

3. Test di tossicità ed efficacia farmacologica

Studi di tossicità dei farmaci su organoidi relativi agli organi principalmente coinvolti nella farmacocinetica come il fegato, i reni e l'intestino.

Pro:

- Sostituzione test sugli animali;
- Comprensione del percorso di assorbimento del farmaco e analisi di metaboliti tossici, non investigabili, invece, nell'animale.

Contro:

- Mancanza di sistema immunitario negli organoidi (scetticismo di alcuni scienziati sul completo rimpiazzo dei test sugli animali);
- Eterogeneità intrinseca degli organoidi in termini di vitalità, dimensione e forma (complicazione dell'analisi della tossicità dei farmaci e della loro efficacia);
- In passato l'affidamento ai modelli non fisiologici ha contribuito al fallimento di test farmacologici.

4. Medicina personalizzata

Gli organoidi AdSC-derived hanno permesso dei **test *ex vivo* della risposta ai farmaci di singoli pazienti.**

La medicina personalizzata sfruttando gli organoidi ha permesso di:

- amplificare in vitro biopsie da tessuti di pazienti malati in modo da ottenere sufficiente materiale per il sequenziamento e da rivelare la causa delle mutazioni o, più in dettaglio, il profilo fenotipico per avere regimi di trattamento più mirati.
- identificare e trattare con successo pazienti con una rara mutazione del CFTR, i quali altrimenti non avrebbero potuto accedere ai farmaci introdotti recentemente.
- effettuare esperimenti (ancora in corso) che hanno rivelato la validità e l'applicabilità di organoidi affetti da cancro nella valutazione della risposta dei farmaci a livello individuale.
- identificare trattamenti più efficaci minimizzando gli effetti collaterali.

5. Medicina rigenerativa

Causa:

La limitata disponibilità di donatori sani e complicazioni inerenti al rigetto nei trapianti allogenici sottolineano la necessità di avere nuove fonti di tessuto sano.

- La possibilità di espandere organoidi da singole AdSCs ha permesso il successivo trapianto sicuro negli animali: fu trapiantato un organoide di intestino tenue nel colon di un topo e si vide che questo manteneva la stabilità fenotipica dell'organoide. Può, quindi, risultare vantaggioso modificare le condizioni di coltura per espandere selettivamente cellule staminali a discapito di quelle differenziate prima di trapiantarle.
- Lo sviluppo e ottimizzazione di organoidi pancreatici potrebbero rivoluzionare il trattamento diabetico e la creazione di un organoide neurale più fisiologico permette il trattamento di malattie neurodegenerative come il Parkinson.

6. Ingegneria genetica

La stabilità genetica delle colture di organoidi combinata con la loro capacità di mimare *in vitro* il fenotipo dei disturbi umani, e la necessità di nuovi strumenti di ingegneria genetica per la manipolazione del genoma umano, ha aperto incredibili opportunità per ottenere una conoscenza molecolare dello sviluppo umano e dei suoi disturbi.

L'ingegneria genetica trova **applicazione nelle colture di cellule staminali per la correzione genetica dei disturbi monogenici umani**. La *ricombinazione omologa* (HR), ovvero lo scambio di informazione genetica fra molecole omologhe di DNA, è stata sviluppata sull' ESCs del topo mostrando un'alta frequenza di eventi HR.

Tale metodo ha permesso di:

- modificare selettivamente il genoma del topo, generare un topo geneticamente modificato e di capire le funzioni dei geni dei mammiferi;
- modificare il nostro codice genetico per curare malattie monogeniche ed eradicare virus integrati nel genoma umano.

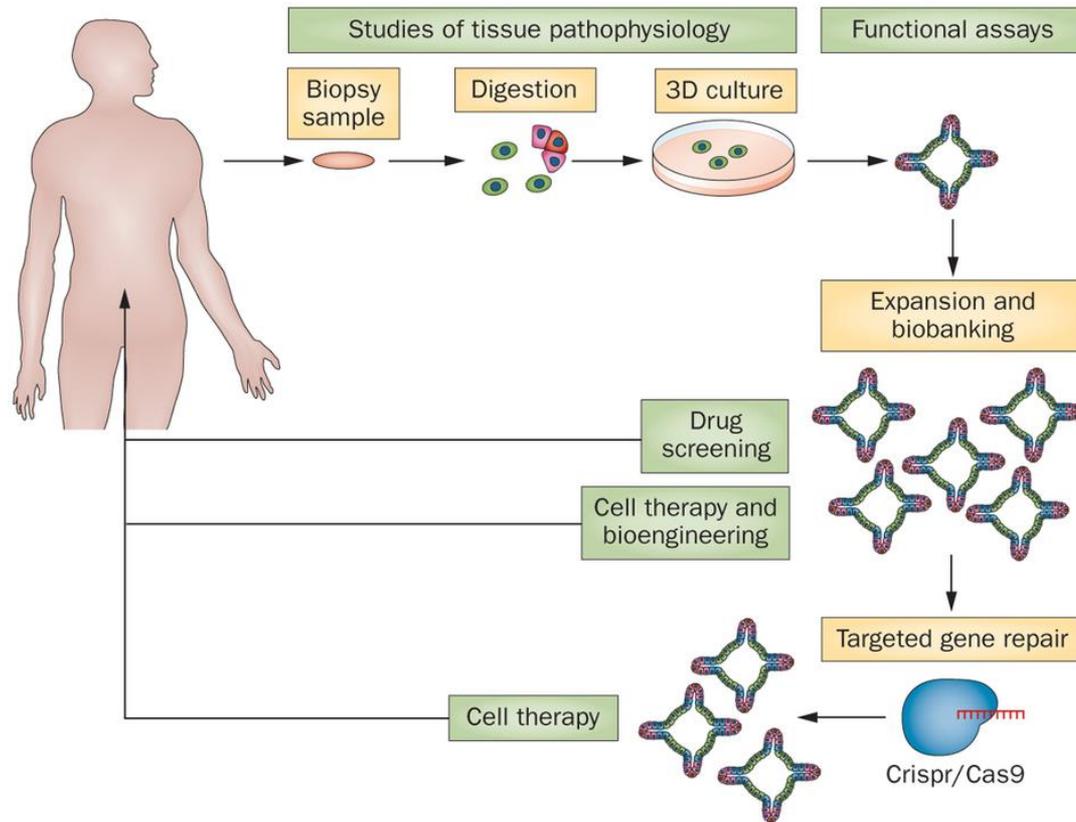
Comunque nelle hPSCs la frequenza di eventi HR risulta essere molto più bassa del topo.

are

Application	Pros	Cons
Fundamental research	Suitable for stem cell biology, cell-cell interaction and cell-ECM interaction studies (in co-culture)	Not suitable for cell biology of fully mature hepatocytes or cholangiocytes due to the low differentiation potential
Disease modeling	Cell banking possibility Patient-derived cells with low invasive techniques	If fully matured epithelial cells are needed to model the disease, improved differentiation of organoids may be necessary
Precision/personalized medicine	Patient-specific cell culture systems Potential for genome editing	Selective procedure for corrected clones are needed
Drug screening/toxicology	Suitable for long-term testing	Need for improved differentiation if mature hepatocytes are necessary
Transplantation	No risk for teratoma Potential for gene correction and autologous transplantation	Low differentiation potential New protein expression upon gene correction requiring immunosuppression

Nuove frontiere e nuovi sviluppi (1)

- Correzione delle mutazioni genetiche responsabili delle patologie ereditarie mediante *genome editing* con tecnologia CRISPR;
- Progettazione di terapie e trattamenti personalizzati;

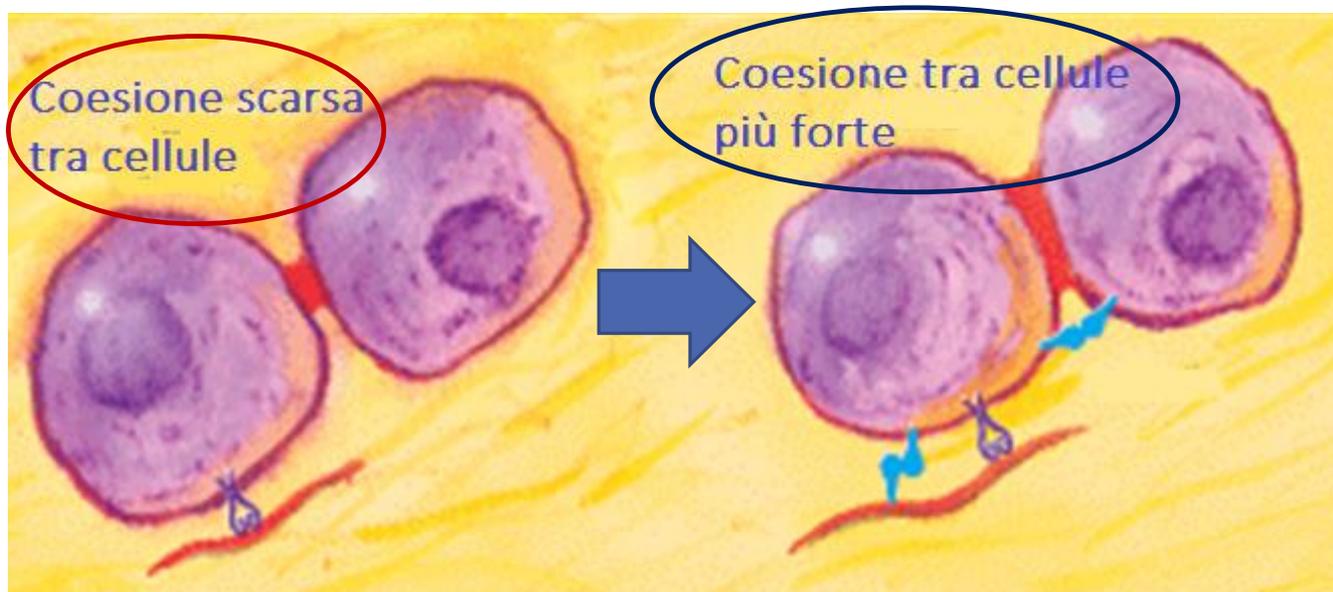


Repair of *CFTR-ΔF508* in a single colon stem cell from
a Cystic Fibrosis Patient:
CRISPR/Cas9-enhanced homologous recombination



Nuove frontiere e nuovi sviluppi (2)

- Miglioramento delle interazioni cellula-cellula;
- Sostituzione alla sperimentazione animale (gatti, topi e cani) nella medicina traslazionale e rigenerativa sull'uomo;
- Sviluppo di nuove terapie nel campo veterinario;
- Superamento delle problematiche etiche attraverso l'utilizzo di organoidi derivati dalla differenziazione di iPSC e non da ESC;



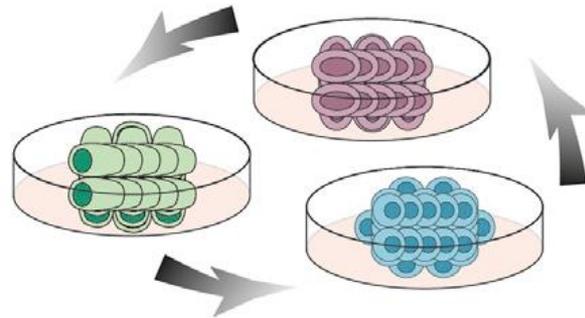
Nuove frontiere e nuovi sviluppi (3)

- Incremento dell'efficienza della differenziazione *in vitro* attraverso miglioramento della matrice di coltura;
- Riduzione dei costi di fabbricazione (costo medio 150\$);
- Perfezionamento delle strategie di medicina rigenerativa mediante:
 - Trasfezione
 - Trasduzione
 - Screening ad alto rendimento
 - 3D Imaging



Molto altro ancora c'è da fare! (1)

- Miglioramento metodi di somministrazione di ossigeno e nutrienti (vascolarizzazione e sistemi micro-fluidici) per aumentare il potenziale di crescita degli organoidi;
- Progettazione di sistemi in grado di mettere in contatto vari tipi di organoidi che permettano lo studio della sinergia tra organi diversi nella generazione di una risposta globale alle sollecitazioni esterne;



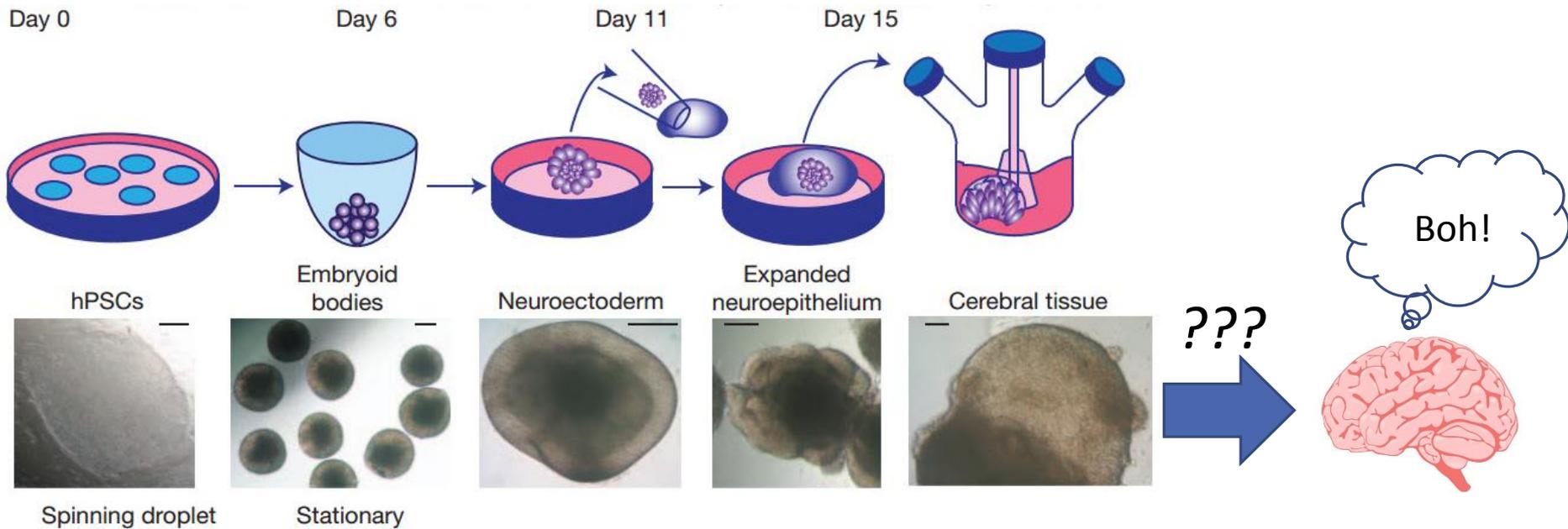
Multiplexed models
"on-a-chip"

Molto altro ancora c'è da fare! (2)

- Riproduzione in vitro delle condizioni della fase embrionale (complessa interazione di diverse citochine, fattori di crescita e fattori di trascrizione) che influenza il destino e la differenziazione delle cellule adulte;
- Sostituzione della *laminina*, componente fondamentale delle matrici di coltura (Matrigel), che permette la proliferazione e la sopravvivenza delle SC ma inibisce la differenziazione. Rimpiazzo con collagene.

Molto altro ancora c'è da fare! (3)

- Unificazione dei protocolli soprattutto se la coltura contiene tipi multipli di iPSC;
- Sviluppo di tecniche sempre più adatte allo studio di configurazioni 3D complesse;
- Sviluppo di organizzazione su macro scala.



Conclusioni

- *Migliore rappresentazione strutture in vivo rispetto al 2D*
- *Campo in continuo sviluppo —> nuove tecniche 3D*
- *Informazioni sui meccanismi regolatori e di risposta degli organi*
- *Stabilità genetica*
- *Dati clinici più precisi e personalizzabili*
- *Organoidi utili per*
 - > *studio dei disturbi ereditari*
 - > *nuove strategie di trattamento*
 - > *correzione disturbi genetici*



Il percorso di riparazione del DNA è uguale per le diverse tipologie di coltura?

Queste culture potranno fornirci informazioni sullo sviluppo embrionale, la crescita post-natale o la formazione degli organi adulti?

Possiamo ottenere dalle colture in vitro organi trapiantabili?

Possiamo ottenere le AdSCs dalle ESCs?



<<There are certain questions you can't really address because they depend upon the physiology of the whole organism.>> Daniel St. Johnston