

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica

Scuola di Dottorato di Ricerca in
SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE

Dottorato di Ricerca in
SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE

(Settore scientifico-disciplinare MED13)

XXIII CICLO

**Ruolo della pathway di Notch nella regolazione
dell'equilibrio tra danno e rigenerazione nelle
malattie glomerulari**

Tutor:

Prof.ssa Paola Romagnani

Tesi di Dottorato di:

Dr.ssa Lara Ballerini

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gianni Forti

INDICE

1 INTRODUZIONE	3
1.1 LE CELLULE STAMINALI	8
1.1.1 Caratteristiche delle cellule staminali	9
1.1.2 Tipi di cellule staminali	14
1.1.3 Fonti di cellule staminali adulte.....	20
1.2 LE CELLULE STAMINALI RENALI	31
1.3 LA NICCHIA STAMINALE	44
1.3.1 Principali nicchie staminali identificate.....	53
1.3.2 La nicchia staminale renale.....	58
1.4 LA VIA DI SEGNALAZIONE DI NOTCH	64
1.4.1 La via di segnalazione canonica ed i suoi componenti	66
1.4.2 Regolazione della via di segnalazione	71
1.4.3 Il ruolo di notch nei sistemi staminali: identificazione della “stem cell pathway”?	78
2 MATERIALI E METODI	97
Pazienti	97
Colture cellulari di progenitori renali umani e differenziamento in vitro	97
Saggi di proliferazione cellulare.....	97
Infezione dei progenitori umani.....	98
Sistema reporter RBP-J.....	98
Analisi del ciclo cellulare e dello staining PI/Annessina V	99
Immunofluorescenza e microscopia confocale.....	99
Analisi della morfologia renale e quantificazione delle cellule positive per nefrina e delle cellule mitotiche	100
Microscopia elettronica di trasmissione.....	100
RT-PCR quantitativa Real-Time	100
Modello di nefropatia indotta da adriamicina in topi SCID.....	100
Analisi statistica.....	102
3 RISULTATI	103
L’attivazione di Notch induce la proliferazione dei progenitori renali	103
La down-regulation di Notch non è necessaria per il differenziamento dei progenitori renali in podociti ma è essenziale per la loro sopravvivenza	105
L’attivazione di Notch regola in modo diverso la progressione del ciclo cellulare e l’arresto ai checkpoint nei progenitori renali e nei podociti.....	108
Attivazione della via di segnalazione di Notch nei progenitori renali e nei podociti in pazienti affetti da disordini glomerulari correlati al danno podocitario.....	111
L’inibizione di Notch regola diversamente il danno e la rigenerazione podocitaria in topi affetti da FSGS	113
FIGURE	117
4 DISCUSSIONE	133
BIBLIOGRAFIA	140
INDICE DELLE ABBREVIAZIONI	160

1 INTRODUZIONE

L'insufficienza renale cronica (*Chronic Kidney Disease*, CKD) è una delle principali cause di mortalità e morbilità nei Paesi occidentali e stime recenti riportano che la sua prevalenza, riferita intorno all'11% nella popolazione adulta, sia in crescita (1). La sua progressione verso l'insufficienza renale terminale (*End-Stage Renal Disease*, ESRD) comporta la necessità di una terapia sostitutiva, rappresentata attualmente dalla dialisi extracorporea e dal trapianto di rene, i costi per la realizzazione e gestione dei quali superano in modo consistente quelli applicati al trattamento di altre importanti patologie che affliggono i Paesi industrializzati, tra cui ad esempio la malattia neoplastica (1).

La scarsa conoscenza delle proprietà rigenerative del rene (2) e la sua complessità anatomica e funzionale hanno rappresentato senza dubbio un importante ostacolo alla ideazione e messa a punto di progetti terapeutici alternativi a quelli disponibili e soprattutto finalizzati al recupero, e ove possibile al ripristino, della funzione renale. Esistono tuttavia numerosi dati, ottenuti sia in modelli sperimentali animali che nell'uomo, che sostengono l'ipotesi che la remissione di malattia e la regressione del danno renale siano eventi possibili (3) almeno negli stadi precoci di CKD, quando sono ancora mantenute una funzione residua e l'istologia dell'organo.

La CKD è caratterizzata, indipendentemente dal tipo specifico di malattia glomerulare che la determina, da un marcatore istologico comune: la sclerosi glomerulare, spesso associata ad analoghe modificazioni a carico del distretto vascolare e tubulo-interstiziale, suggerendo la possibile esistenza di una "via finale comune" a tutte le malattie glomerulari responsabile della progressione del danno

(4). Indipendentemente dalla natura dell'insulto iniziale, infatti, quando una porzione significativa del tessuto renale è stata distrutta, si assiste ad un declino della capacità filtrante dell'organo associata ad una serie di cambiamenti adattativi che si instaurano nel nefrone e che finiscono per alimentare il processo patologico in corso, causando la formazione di una cicatrice ed un incremento della perdita di nefroni tale da perpetuare un circolo vizioso che culmina con lo sviluppo di ESRD. La glomerulosclerosi è infatti responsabile di oltre il 90% dei casi di ESRD nell'uomo (5).

Tra i principali fattori implicati nella genesi e nella progressione del danno si possono annoverare modificazioni emodinamiche (in particolare l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone), citochine, fattori di crescita, dislipidemia, proteinuria, predisposizione individuale allo sviluppo di CKD, determinata ad esempio da fattori genetici e da un basso numero di nefroni (6). Oltre a questo è noto anche che l'insulto inferto selettivamente ad uno qualsiasi dei tipi cellulari che prendono parte alla costituzione del glomerulo è in grado di determinare lo sviluppo di malattia glomerulare (7); tuttavia, mentre il danno a carico delle cellule mesangiali ed endoteliali può essere rapidamente riparato attraverso la replicazione e la sostituzione delle cellule perse da parte di quelle adiacenti (5) (7), la lesione, la perdita o la disfunzione di podociti, che sono cellule altamente differenziate e che pertanto, come i neuroni, possiedono scarse o nulle proprietà rigenerative (5) (7), rappresentano un evento critico nella determinazione del danno e quindi nello sviluppo della glomerulosclerosi (8). L'entità della perdita podocitaria presenta peraltro una correlazione con la gravità del danno e della conseguente proteinuria ed è un marker di progressione di malattia in pazienti affetti, ad esempio, da nefropatia diabetica o glomerulosclerosi focale e segmentale (*Focal Segmental*

Glomerulosclerosis, FSGS) (9), che sono cause importanti e diffuse di CKD ed ESRD (Figura 1).

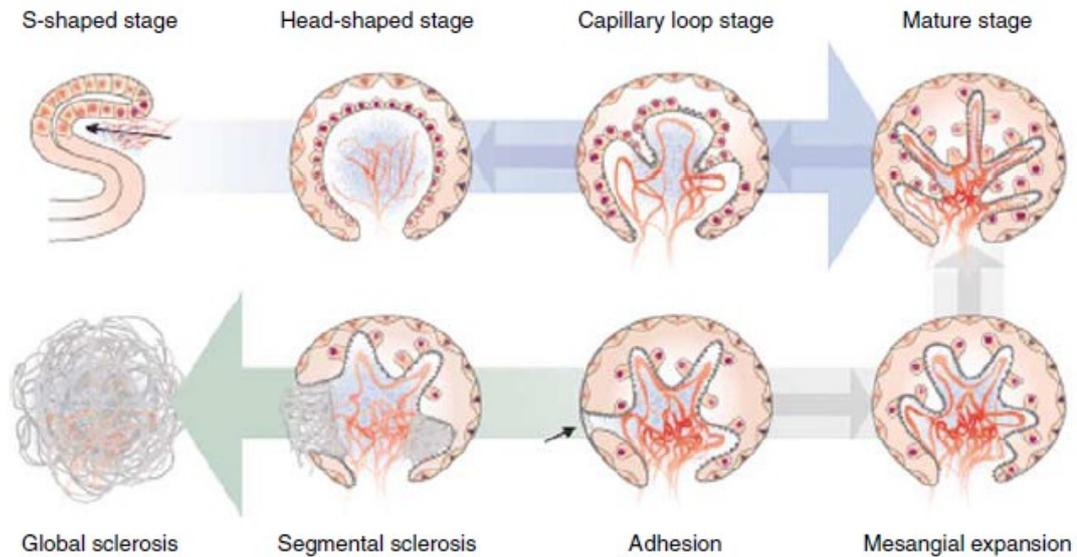


Figura 1. Stadi dello sviluppo glomerulare e progressione del danno: il ruolo del podocita. Durante lo sviluppo embrionale i podociti (nucleo rotondo) acquisiscono il fenotipo di cellule mature ed esprimono markers di superficie specifici (S-shaped stage), si separano dalle cellule epiteliali parietali (nucleo triangolare) e formano quello che diventerà lo spazio di Bowman. Nelle fasi successive (Head-shaped stage e Capillary loop stage) lo strato superficiale di cellule si approfonda nella matassa capillare allargando la superficie disponibile per la filtrazione; si formano i pedicelli podocitari, che si interdigitano tra le cellule e prendono rapporto con la sottostante membrana di filtrazione glomerulare, sintetizzata dai podociti stessi e dalle cellule endoteliali e mesangiali adiacenti. L'ottimizzazione di questi processi conduce alla formazione del glomerulo maturo (Mature glomerulus). Quando un insulto inferto al glomerulo determina un danno o una perdita di podociti maturi si verifica dapprima un'espansione mesangiale (Mesangial expansion), poi la formazione di zone di adesione tra la superficie filtrante e la capsula di Bowman (Adhesion formation) ed infine lo sviluppo di sclerosi, dapprima a carico di una porzione limitata del glomerulo (Segmental sclerosis), successivamente diffusa a tutta la sua struttura (Global sclerosis). Modificato da *Wiggins RC, Kidney Int,2007;71(12):1205-14.*

È pertanto opinione comune che il podocita rivesta in questo processo un ruolo da assoluto protagonista (7) (8) (10) (11) (12) (13).

Molte delle caratteristiche del podocita lo configurano come un elemento particolarmente suscettibile al danno. Il podocita maturo è una cellula terminalmente differenziata ed altamente specializzata nel mantenimento della normale permeabilità

della membrana di filtrazione glomerulare, tanto che uno dei primi segni di alterazioni a suo carico è rappresentato dal distacco e dalla retrazione dei pedicelli; è normalmente esposto ad elevati regimi pressori (circa 60 mmHg) che esercitano un significativo livello di stress meccanico (14), e, nonostante sia capace di provvedere ad una limitata sintesi di DNA, non è in grado di proliferare (5) (10) (14) (15). Ne consegue che la morte o la perdita dei podociti glomerulari sia responsabile di uno stato di permanente “insufficienza podocitaria” (14). La perdita di funzionalità renale che ne deriva presenta caratteristiche comuni a quelle che si riscontrano in altri tessuti ed organi che, come il sistema nervoso o il cuore, sono costituiti principalmente da cellule con un elevato livello di specializzazione e, per questo fine, caratterizzate da un differenziamento di tipo terminale (9).

Tuttavia, al pari di quanto riscontrato anche in altri distretti, esiste un’ampia mole di dati sperimentali e clinici a sostegno della possibilità di recupero del danno glomerulare e quindi podocitario (3) (16) (17) (18) (19). Stanti le caratteristiche precedentemente illustrate per il podocita, appare evidente che il meccanismo più probabilmente coinvolto nella rigenerazione renale e nella riparazione del danno sia rappresentato dal reclutamento e dall’attivazione di cellule staminali residenti (9).

Le cellule staminali (*Stem Cells*, SC), capaci di auto-rinnovarsi e di prendere parte al mantenimento dell’integrità strutturale e funzionale dei tessuti, sono, infatti, particolarmente indicate a tale scopo. Nonostante il rene sia un organo dotato di un potenziale replicativo cellulare limitato, è ormai accertata l’esistenza di una popolazione di cellule con caratteristiche di staminalità analoga a quelle descritte in precedenza in organi e tessuti caratterizzati da un più spiccato *turnover* cellulare, come il sangue, la cute e il tratto digestivo, e capace di attendere alle esigenze omeostatiche e di replicazione e riparazione dell’organo (20) (21) (22).

Tuttavia, l'osservazione che le capacità rigenerative renali sono limitate, si attuano soltanto in alcune circostanze e non si concretizzano, come invece accade in altre specie animali, nella formazione di nuovi nefroni (3) (la perdita di un potenziale rigenerativo completo è probabilmente il prezzo da pagare per garantire la complessità tipica degli organismi evolutivamente superiori, come l'uomo (23)), e d'altra parte i dati sperimentali a sostegno del coinvolgimento critico delle SC renali nella genesi di lesioni tipiche di alcune patologie causa di ESRD (24), suggeriscono la necessità imprescindibile di approfondire le conoscenze relative alla biologia ed ai meccanismi molecolari che regolano le funzioni di queste cellule, con la finalità di individuare nuovi target terapeutici per la CKD.

Le vie di segnalazione coinvolte nella regolazione delle funzioni delle SC/cellule progenitrici sono altamente conservate in molti organi e tessuti adulti (25), sottolineandone ovviamente l'importanza critica. In particolare, la *pathway* di Notch influenza numerosi processi importanti che realizzano le proprietà e le caratteristiche delle cellule staminali in diverse fasi del loro sviluppo, inclusa la scelta tra auto-rinnovamento e differenziamento (25) (26) (27) (28) (29).

Pertanto, obiettivo del lavoro di cui si illustrano i risultati, è stato quello di studiare il possibile coinvolgimento ed il ruolo del *signaling* di Notch nella regolazione della crescita e del differenziamento delle cellule progenitrici renali.

1.1

LE CELLULE STAMINALI

La leggenda narra che quando Prometeo trasgredì le leggi degli antichi dèi e rubò il fuoco per donarlo agli esseri umani ed insegnare loro la civiltà e le arti, l'ira degli dèi lo colpì con una terribile punizione: Giove incatenò il grande Titano ad un fianco del Monte Caucaso affinché un'aquila facesse preda ogni giorno del suo fegato, il quale continuava però a rigenerarsi, tanto rapidamente quanto più voracemente veniva divorato (30).

Nel mito di Prometeo viene descritta per la prima volta la strabiliante abilità dell'organismo umano di "riparare se stesso". Durante il corso della vita, infatti, il nostro organismo è soggetto a numerosi e ripetuti insulti (le ferite, i traumi, le malattie) i quali, tuttavia, solo raramente finiscono per creare danni irreversibili a carico degli organi e dei tessuti.

Le prime descrizioni scientifiche della capacità rigenerativa di un essere vivente risalgono agli studi condotti nel 1740 da Trembley sulle idre; successivamente tali osservazioni sono state confermate ed estese ad un ampio numero di organismi del regno animale, dagli urodéli ai pesci, fino agli esseri umani, benché in questi ultimi sia stata evidenziata la limitatezza di tale proprietà. Questo costituisce probabilmente il prezzo da pagare per l'acquisizione di un elevato livello di complessità funzionale, tipica degli organismi evolutivamente più avanzati (23).

1.1.1 CARATTERISTICHE DELLE CELLULE STAMINALI

È ormai opinione comune che la capacità rigenerativa e di riparazione, il mantenimento dell'omeostasi e quindi il funzionamento ottimale di un tessuto e di un organo, ed in definitiva di un organismo, è legata alla presenza, al reclutamento, alla proliferazione ed al differenziamento di cellule indifferenziate ed auto-rigeneranti, capaci cioè di dar origine, attraverso processi di divisione cellulare, a cellule identiche a loro stesse, alle quali ci si riferisce comunemente con il termine di cellule staminali (30).

Per essere definita tale, una cellula staminale deve avere delle caratteristiche funzionali critiche (31) (32) (33) (Figura 2).

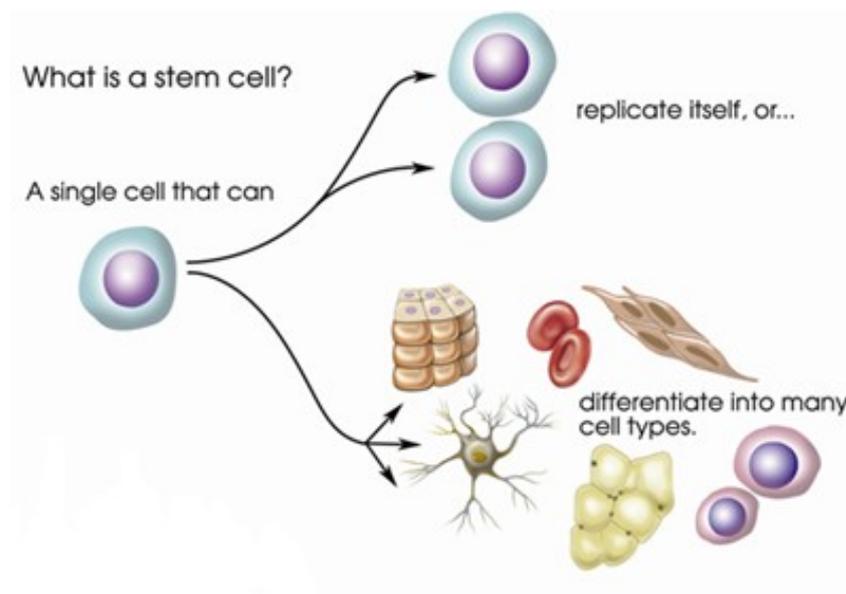


Figura 2. Proprietà distintive delle cellule staminali: il self-renewal e il differenziamento. Modificato da Twomey C for The National Academies, *Understanding Stem Cells: An Overview of The Science and Issues*.

In primo luogo deve possedere la capacità di AUTO-MANTENIMENTO (o auto-rinnovamento, self-renewal) (32) (34) (35), ovvero deve essere capace di perpetuare sé stessa indefinitamente, sostenendo anche più di 160 divisioni cellulari senza andare incontro a trasformazione neoplastica e mantenendo le proprie caratteristiche

funzionali (35) (tale limite è stato scelto arbitrariamente sulla base dell'osservazione che la maggior parte delle cellule somatiche, quando poste in coltura, è capace di effettuare meno di 80 duplicazioni cellulari prima dell'arresto replicativo o della senescenza). In altre parole, le SC devono essere capaci di compiere delle divisioni cellulari simmetriche o asimmetriche, generando in ogni caso almeno una cellula figlia dotata del loro medesimo potenziale di sviluppo, ossia caratterizzata dal mantenimento della multi-potenza, come accade per la maggior parte delle SC di mammifero, come ad esempio le cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC), o di uno stato indifferenziato, più caratteristico invece delle SC che generano un unico tipo di cellula matura, come ad esempio le SC spermatiche (32) (34) (35) (36). In ciascun organismo, l'elevata capacità proliferativa di un *pool* di cellule staminali è fondamentale per il mantenimento degli organi.

In secondo luogo, la cellula staminale deve mostrare un POTENZIALE MULTIDIFFERENZIATIVO, ossia deve essere in grado di differenziarsi in numerosi diversi tipi cellulari (32) (34) (35) (37). Ciò avviene mediante divisione asimmetrica (o emi-eteroplastica), ovvero attraverso la generazione di due cellule figlie, di cui una identica alla cellula madre e dotata delle medesime proprietà funzionali, e l'altra destinata a proliferare e poi differenziare, perdendo la capacità di auto-rinnovamento. Per differenziamento s'intende l'acquisizione, in seguito ad opportuni stimoli, di caratteristiche morfologiche, fenotipiche e funzionali che appartengono ad un tipo cellulare specifico; pertanto, durante il differenziamento, mentre alcuni geni si attivano, altri vengono inattivati affinché la cellula indifferenziata si specializzi. Sulla base delle potenzialità differenziative, è possibile distinguere le cellule staminali in (35) (37):

- cellule staminali totipotenti: in grado da sole di sviluppare un intero organismo, perché capaci di generare tutte le cellule ed i tessuti che costituiscono l'embrione ed i tessuti extra-embryonali, tra cui la placenta, che ne supportano la crescita in utero; sono rappresentate dall'ovocita fecondato (zigote) e dalle cellule che originano dalle prime due divisioni cellulari di questo e che, se posizionate nella cavità uterina, possono svilupparsi in feto.
- cellule staminali pluripotenti: che non possono generare un organismo completo, poiché non sono capaci di generare la placenta e gli altri tessuti di supporto, ma che sono in grado di specializzarsi in cellule appartenenti ad ognuno dei tre foglietti germinali; sono rappresentate dalle cellule che, a partire dal quarto giorno dopo la fecondazione, costituiscono la cosiddetta “massa cellulare interna” (*Inner Cell Mass*, ICM), da cui originano appunto tutti i tessuti dell'organismo. Recentemente, tuttavia, il sorprendente sviluppo della tecnologia della “riprogrammazione cellulare” ha consentito di ottenere cellule staminali pluripotenti a partire da cellule somatiche adulte, essenzialmente attraverso l'induzione in queste ultime della produzione di fattori di trascrizione capaci di riprogrammare il loro profilo di espressione genica e di conseguenza di modificarne il fenotipo e le potenzialità (38) (39).
- cellule staminali multipotenti: capaci di differenziare in un numero limitato di tipi cellulari, appropriato per il tessuto di appartenenza. Ne sono esempi le cellule staminali dell'intestino tenue, che possono generare quattro tipi cellulari specializzati (cellule di Paneth, cellule caliciformi mucipare, cellule colonnari con funzione di assorbimento e cellule entero-endocrine), o quelle del sistema nervoso centrale, che hanno un potenziale differenziativo tri-lineare (neuroni, oligodendrociti ed astrociti).

- cellule unipotenti: definite più correttamente cellule progenitrici piuttosto che staminali, capaci di differenziare in un unico tipo cellulare. Ne sono esempi le cellule dello strato basale dell'epidermide, che sono in grado di generare esclusivamente cheratinociti.

La terza proprietà distintiva della cellula staminale è la CLONOGENICITÀ (32) (34) (35), ossia la capacità di moltiplicarsi e di dare origine ad una progenie di cellule con caratteristiche identiche alla cellula staminale parentale. Ciò nonostante, le cellule staminali risultano lentamente ciclanti, ovvero impiegano un tempo significativamente elevato per completare il proprio ciclo replicativo; da un punto di vista teleologico questo potrebbe rappresentare il mezzo tramite il quale tali cellule limitano le possibilità di acquisire mutazioni nel proprio patrimonio genetico, che sono favorite appunto dalla duplicazione cellulare.

In alternativa, la cellula staminale può essere definita e descritta da un punto di vista molecolare: a tale scopo è opportuno chiarire il concetto di “staminalità” (34) (40). Con questo termine si vuol indicare quel comune background molecolare che controlla le proprietà precedentemente descritte di tutte le cellule staminali. Infatti, nonostante le cellule staminali debbano far fronte alle diverse richieste dei vari microambienti di appartenenza, si ritiene che esse condividano specifiche caratteristiche genetiche che, in associazione con le proprietà funzionali descritte, forniscono una più precisa definizione di cellula staminale. A tal proposito, lo studio del profilo trascrizionale delle cellule staminali ha fornito recentemente delle conferme interessanti (40). In primo luogo, le cellule staminali sono in grado di dialogare tramite un'ampia gamma di fattori di crescita e di molecole di superficie, come ligandi, recettori e molecole di adesione, ed esprimono i costituenti delle vie di segnalazione a valle, che consentono a tali stimoli di esercitare i loro effetti. Ad

esempio, le molecole TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), Notch, Wnt e JAK/STAT (*Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription*) regolano la capacità di auto-rinnovamento delle SC attivando vie specifiche di trasduzione del segnale (41). Inoltre, le cellule staminali esprimono molti fattori coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare come, ad esempio, quelli responsabili del prolungamento e dell'arresto nella fase G1 del ciclo cellulare (caratteristico delle cellule staminali adulte quiescenti) o della rapida progressione attraverso i *checkpoint*, al fine di garantire una rapida replicazione (caratteristico delle cellule staminali embrionali e di quelle adulte mobilizzate). Le SC condividono anche l'espressione di geni di "staminalità" come, ad esempio, Nanog ed Oct-4 (42) (43) (44), scoperti per la prima volta nelle cellule staminali embrionali e successivamente individuati anche in quelle adulte. Oct-4 è coinvolto nel mantenimento del self-renewal, mentre Nanog è essenziale per la tutela del fenotipo pluripotente, sia *in vivo* che *in vitro*. Le due proteine collaborano al fine di garantire un profilo staminale: infatti, i loro livelli di espressione influenzano fortemente il fenotipo cellulare.

Le SC, inoltre, possiedono la capacità di riparazione attiva del DNA e di resistenza all'apoptosi e presentano generalmente livelli piuttosto elevati di espressione dell'enzima telomerasi che, attraverso il mantenimento della lunghezza dei telomeri, consente il continuo proliferare della cellula. In aggiunta a ciò, i diversi tipi di SC condividono alcune modalità di risposta allo stress e di citoprotezione. È stato dimostrato che, in seguito all'esposizione a vari agenti citotossici, le SC incrementano la trascrizione di proteine transmembrana responsabili della multiresistenza ai farmaci (*Multidrug Resistance Transporters*), dell'ubiquitina, delle proteine anti-apoptotiche e di molti enzimi appartenenti ai sistemi di

detossificazione. Il complesso di queste osservazione risulta molto utile ai fini pratici di identificare ed isolare le cellule staminali.

Infine, un interesse sempre crescente è rivolto all'identificazione di markers di superficie caratteristici delle SC, tra cui ad esempio CD133 (45) e CD34 (34), utilizzati per l'isolamento delle cellule staminali ematopoietiche dal sangue periferico e dal midollo osseo. Al momento però, benché l'utilizzo di tali sistemi di identificazione delle SC ne renderebbe molto più agevole l'isolamento e, con questo, lo studio dei meccanismi che ne regolano le funzioni, nessuno di questi markers si è dimostrato sufficientemente specifico nella maggior parte dei tipi di SC identificate (46).

1.1.2 TIPI DI CELLULE STAMINALI

Sulla base della loro provenienza, le cellule staminali possono essere distinte in due categorie (32) (34) (35): le cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells*, ESC) e le cellule staminali adulte (*Adult Stem Cells*, ASC).

Le CELLULE STAMINALI EMBRIONALI derivano dalla ICM della blastocisti (stadio embrionale al 4°-5° giorno dopo la formazione dello zigote). Queste cellule possono essere prelevate in un preciso e limitato periodo di vita embrionale che va dal 4° al 6° giorno, prima dell'impianto dell'embrione in utero (35) (47). Pur non essendo in grado di generare un intero individuo, le ESC possiedono le tre caratteristiche principali che contraddistinguono le cellule staminali: la capacità di auto-mantenersi, la clonogenicità e la capacità di differenziare in molteplici tipi cellulari specializzati. Oltre a ciò, le ESC sono capaci di proliferare in modo

illimitato in coltura, mantenendo uno stato indifferenziato ed un cariotipo diploide normale.

Utilizzando un modello sperimentale murino, è stato possibile mettere in risalto la capacità delle ESC di contribuire alla formazione di tutte le linee cellulari somatiche e germinali. Infatti, le ESC murine, se inoculate all'interno di una nuova blastocisti, vengono integrate in tutti e tre i foglietti embrionali, incluse le cellule germinali, dando origine ad animali chimerici (48) (49). Una prova indiretta di questa capacità multidifferenziativa, è data inoltre dal fatto che numerose linee di ESC sono in grado di formare teratomi se inoculate nel topo immunodeficiente (50). I teratomi sono tumori costituiti da tipi cellulari derivati dai tre foglietti embrionali. Ad ulteriore conferma delle loro potenzialità differenziative, le ESC, se coltivate in sospensione, differenziano spontaneamente dando origine ai corpi embrioidi (50) (51) (52), strutture che presentano al loro interno cellule appartenenti ai tre foglietti germinali.

Da un punto di vista più strettamente molecolare, le ESC presentano un profilo trascrizionale e di regolazione del ciclo cellulare unico: esprimono infatti elevati livelli di Nanog, Oct-4 e Sox-2 (53) (36), fattori di trascrizione responsabili del mantenimento della pluripotenza il primo, e della capacità di auto-mantenimento gli altri due, attraverso la formazione di una complessa rete di interazioni molecolari reciproche che regola l'espressione di geni critici (36). Inoltre, le ESC non mostrano inattivazione del cromosoma X, presentano una fase G1 del ciclo cellulare estremamente breve, mancano del *checkpoint* della fase G1 e quindi rimangono nella fase S del ciclo cellulare per la maggior parte della loro vita (36). Infine, a differenza delle cellule somatiche differenziate, non richiedono stimoli esogeni per iniziare la replicazione e non subiscono l'arresto del ciclo cellulare dipendente da p53 in risposta ad un danno del DNA (36). Quando le ESC sono avviate al processo

differenziativo, la fase G1 si allunga, il *rate* proliferativo si riduce e le cellule necessitano di stimoli mitogeni per proliferare.

Esistono anche altre cellule staminali ottenibili dall'embrione. Allo stadio di blastocisti, oltre alle cellule delle ICM, una distinta popolazione di cellule staminali embrionali si identifica a livello del trofoblasto ed è per questo denominata trofoblastica. Le ESC trofoblastiche coltivate *in vitro* sono in grado di differenziare in tutte le linee cellulari del trofoectoderma, comprese le cellule giganti del sinciziotrofoblasto (54).

Un'altra popolazione di cellule staminali pluripotenti è stata identificata nell'embrione murino allo stadio di gastrula, una fase embrionale successiva a quella di blastocisti. Queste cellule, riconosciute come cellule germinali primordiali (*Primordial Germ Cells*, PGC) (47) (55) ed identificate accanto all'epiblasto, originano nella parete endodermica del sacco vitellino, nei pressi dell'allantoide, intorno alla 6^a settimana dalla fecondazione; grazie alla loro capacità di movimento ameboide, tali cellule si sottraggono alla successiva differenziazione migrando lungo le pareti dell'intestino primitivo e il mesentero dorsale e, giunte in prossimità della linea mediana, inducono la proliferazione dell'epitelio che riveste la cavità celomatica, formando le creste genitali, dove danno luogo alle cellule germinali mature. Le PGC, una volta isolate e messe in coltura, danno origine ad una popolazione di cellule multipotenti, chiamate cellule germinali embrionali (*Embryonic Germ Cells*, EGC) (55), che hanno dimostrato un comportamento in parte analogo a quello delle cellule staminali embrionali, sia negli esperimenti *in vitro* che *in vivo* (55) (56). Tuttavia, le EGC differiscono dalle ESC per le loro diverse caratteristiche di crescita *in vitro*. ESC umane sono state propagate per circa due anni *in vitro*, per diverse centinaia di *population doublings*, mentre le EGC sono

state finora mantenute solo per 70-80. Inoltre, le EGC differiscono dalle ESC in quanto caratterizzate da una minore capacità di formare teratomi *in vivo* e di produrre animali chimerici, probabilmente dovuta alla loro comparsa più tardiva durante l'ontogenesi (55).

Le CELLULE STAMINALI ADULTE sono cellule indifferenziate che si localizzano nei tessuti specializzati dell'organismo adulto. Queste cellule possiedono solo in parte le caratteristiche morfologiche, strutturali, molecolari e antigeniche che si riscontrano nelle cellule differenziate del loro tessuto di appartenenza; inoltre, presentano le caratteristiche tipiche delle cellule staminali, quali la clonogenicità e la capacità di auto-mantenersi indefinitamente (57).

Esse svolgono due funzioni primarie: il mantenimento dell'omeostasi del tessuto e la sostituzione delle cellule morte o danneggiate che avviene in seguito all'instaurarsi di un processo patologico o di un danno tissutale. A differenza di quanto noto per le ESC, non è ancora chiaro in quale fase dello sviluppo embrionale abbiano origine le ASC. Secondo alcuni autori, le ASC si sviluppano dopo la gastrulazione e a seguito del *commitment* tissutale, pertanto il loro potenziale differenziativo è limitato soltanto al foglietto embrionale di origine. Questa teoria sembra essere la più accreditata, benché altri autori ritengano che lo sviluppo delle ASC si verifichi prima della gastrulazione: secondo questa ipotesi le cellule si sottraggono alla restrizione di *lineage* nelle fasi molto precoci dello sviluppo embrionale e successivamente colonizzano specifiche nicchie tissutali, che ne garantiscono il mantenimento e al contempo ne limitano il potenziale differenziativo in relazione al tessuto in cui si localizzano (35) (58).

Negli organi le ASC risiedono in nicchie specifiche, ovvero in regioni privilegiate dei tessuti di appartenenza, dove sarebbero protette da insulti ambientali e

riceverebbero un adeguato apporto ematico. La nicchia consente l'interazione tra le cellule staminali e le altre cellule di supporto, necessarie a produrre fattori utili per prevenirne l'ingresso nel ciclo cellulare. Quindi, la nicchia opera un meccanismo di controllo sull'auto-rinnovamento e sul differenziamento delle SC (59).

Le cellule staminali adulte sono capaci di dare origine a tutti i tipi cellulari del tessuto a cui appartengono, contribuendo così al mantenimento dell'omeostasi ed all'integrità strutturale e funzionale dell'organo, mediante la sostituzione delle cellule mature danneggiate o morte (57).

La capacità di differenziare in risposta ad opportuni stimoli è strettamente legata alla capacità di auto-mantenimento. Queste due proprietà esclusive delle cellule staminali si realizzano attraverso due distinti meccanismi proliferativi (60) (Figura 3).

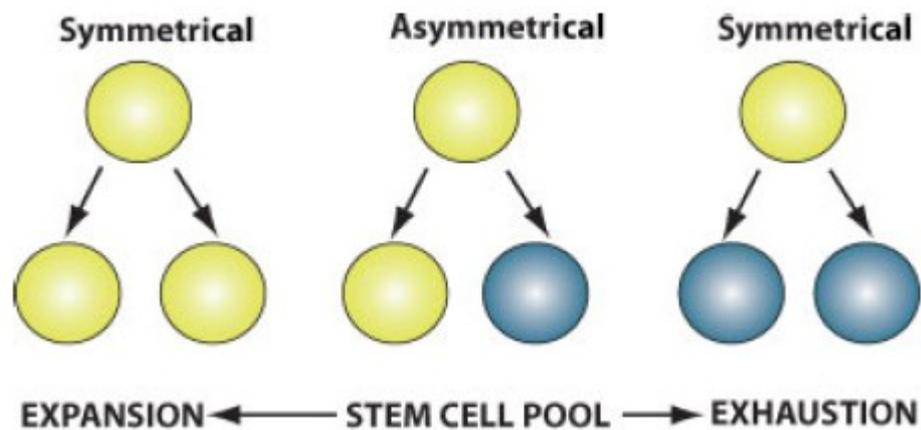


Figura 3. Divisione simmetrica e asimmetrica della cellule staminali e loro possibili conseguenze. Cellule staminali, in giallo. TAC, in blu. Modificato da Alison MR et al, J Pathol,2009;217:144–160.

Il primo si basa su una divisione asimmetrica, nella quale si generano, ad ogni ciclo cellulare, una cellula identica alla cellula madre (staminale) e una più differenziata, che è destinata ad originare una cellula matura, dopo un numero limitato di cicli

cellulari e che è definita cellula di transizione o precursore transitorio di amplificazione (*Transit-amplifying Cell*, TAC). Il secondo meccanismo proliferativo, invece, prevede una divisione di tipo simmetrico. Questo secondo meccanismo è più flessibile perché, secondo le necessità omeostatiche dell'organo, può favorire cicli proliferativi di espansione (da una cellula madre a due cellule figlie identiche alla cellula che le ha generate) oppure cicli differenziativi (da una cellula madre a due cellule figlie più differenziate) (31).

Sebbene le cellule staminali adulte e quelle embrionali condividano molte caratteristiche, le ASC sono più rare e molto più difficili da identificare, isolare e purificare. Il loro numero, infatti, declina progressivamente con lo sviluppo dell'organismo e raggiunge valori minimi e stabili in età adulta. Le ASC si caratterizzano inoltre per un potenziale differenziativo ed una capacità di mantenimento e di sopravvivenza in coltura più limitati rispetto alle ESC.

Ciò nonostante, questi dati contrastano con i risultati degli esperimenti di transfert nucleare, con i quali si dimostra che il nucleo di qualsiasi cellula differenziata può essere riprogrammato a generare una cellula staminale embrionale se inserito in un embrione denucleato, e che pertanto qualsiasi cellula può diventare una cellula staminale se una corretta serie di stimoli è indirizzata dal citoplasma al nucleo (38) (39). Ne consegue che il passaggio evolutivo da zigote a cellula staminale embrionale e da questa a cellula staminale adulta, fino alla cellula differenziata può essere interpretato come un *continuum* caratterizzato da una serie precisa di punti critici soggetti a fine regolazione, il superamento dei quali determina in modo irreversibile il destino della cellula nel corso del suo sviluppo. Se questo è vero, le reali differenze tra cellula staminale embrionale e adulta si riconducono al numero di passaggi critici irreversibili attraversati, la conoscenza dei quali, e delle possibilità e

difficoltà tecniche nel revertirli, fornisce una misura della reale possibilità di ricreare una cellula staminale pluripotente e immortale a partire da una cellula maggiormente differenziata (58).

1.1.3 FONTI DI CELLULE STAMINALI ADULTE

Un crescente interesse è stato rivolto negli ultimi anni alla possibilità di utilizzo terapeutico delle ASC, soprattutto in virtù delle minori implicazioni etiche che presentano rispetto alle ESC. Questo non può ovviamente prescindere dalla conoscenza delle caratteristiche, della funzione e dei limiti di utilizzo che ciascuna popolazione di ASC possiede.

La principale fonte di conoscenze delle caratteristiche e della biologia delle ASC è rappresentata attualmente dalle CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE, che sono storicamente le prime ASC identificate: le cellule staminali ematopoietiche sono state isolate dal midollo osseo del topo nel 1961 da Till e McCulloch (61), come cellule in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari del sangue periferico. Da allora sono state ampiamente studiate, tanto che oggi sono correntemente utilizzate per il trattamento di numerose e diverse malattie ematologiche.

Lo studio della loro capacità di ripopolare il midollo osseo è stato eseguito attraverso l'inoculo in topi privati di qualsiasi precursore ematopoietico mediante irradiazione corporea totale, di cellule prelevate dal midollo di un animale singenico donatore. Le cellule inoculate nel circolo dell'animale irradiato erano in grado di insediarsi in tutti i siti ematopoietici dell'animale ospite, compresa la milza, dove, dopo 10-14 giorni dal trapianto, davano origine alla formazione di noduli di tessuto ematopoietico microscopicamente visibili, ognuno dei quali era, in realtà, il prodotto di un processo

di espansione clonale di una singola cellula che, una volta isolata ed identificata, ha preso il nome di *Colony Forming Units-Spleen* (CFU-S). Analoghi studi eseguiti nell'uomo hanno portato all'identificazione di una popolazione di cellule staminali ematopoietiche dalle caratteristiche analoghe a quella murina (62).

Studi successivi hanno permesso di comprendere l'immunofenotipo sia delle CFU-S (61) che delle HSC umane (63) (64) (65) (66), in modo da permettere una loro rapida e facile individuazione nel contesto di una popolazione cellulare *in vitro* o in un tessuto *in vivo*. Attualmente è possibile identificare, isolare e purificare le HSC utilizzando combinazioni di marcatori di superficie che ne caratterizzano il fenotipo (c-kit⁺, CD34⁺ e Lin⁻). È possibile isolare le HSC anche sulla base di proprietà funzionali, come ad esempio la capacità di espellere il colorante vitale fluorescente Hoechst 33342, fornita dall'espressione di un trasportatore di membrana ABCG1 (*ATP-Binding Cassette Superfamily G Member 1*), appartenente alla famiglia dei canali MDR (*Multi-Drug Resistance*) (67).

Tra le HSC si distinguono le HSC a lungo termine (*Long term-HSC*, LT-HSC), che proliferano per l'intera vita dell'organismo, e le HSC a breve termine (*Short term-HSC*, ST-HSC), discendenti delle LT-HSC, che proliferano per un tempo limitato e successivamente differenziano nei precursori mieloidi e linfoidi.

Fin dagli anni '70 è stata ipotizzata l'esistenza all'interno del midollo osseo di una seconda popolazione di cellule staminali, le CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC, note anche come cellule staminali stromali) (68), ma soltanto negli anni '80 sono state sviluppate adeguate tecniche di isolamento, purificazione e coltura per questa popolazione cellulare.

Le MSC, in analogia con le HSC, presentano elevate potenzialità di self-renewal (69) e sono in grado di differenziare in varie tipologie di cellule dei tessuti connettivi,

quali osso, cartilagine, muscolo, tessuto adiposo, tendini ed altri (70) (71). Le MSC vengono selezionate per la loro mancanza dei markers di superficie CD45 e glicoforina A e separate dalle HSC circolanti attraverso immunoselezione negativa con anticorpi anti-CD14 (monociti-macrofagi), anti-CD31 (cellule endoteliali) e anti-CD11a/LFA-1 (linfociti) (72). Le MSC risultano inoltre uniformemente positive per i markers SH2 (o CD105, endogлина), SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 e Stro-1 ed evidenziano inoltre la co-espressione di geni caratteristici della linea osteoblastica (fosfatasi alcalina, osteocalcina e osteopondina) e di quella adipocitica (lipoproteina lipasi), suggerendo la possibilità che tali cellule stromali costituiscano precursori dotati della capacità di differenziare verso diversi tipi cellulari (72) (73).

Un ruolo di notevole importanza svolto dalle MSC è quello di supporto per la sopravvivenza e per la proliferazione delle HSC (69) (74), che ne suggerisce il possibile utilizzo terapeutico per il miglioramento del trapianto di HSC. Le MSC sono state inoltre utilizzate con successo per correggere difetti ereditari a livello di tessuto osseo o cartilagineo, come dimostrato da esperimenti condotti *in vivo* su animali (75).

Insieme alle MSC è possibile purificare anche le MAPC (75) (*Multipotent Adult Progenitor Cells*), una sottoclasse delle MSC con spiccate caratteristiche differenziative, ma con un fenotipo leggermente diverso.

Negli ultimi anni si sono accumulate evidenze circa la presenza nel sangue periferico di soggetto adulto di un'altra popolazione di cellule progenitrici derivate dal midollo osseo, caratterizzate dall'espressione dei marcatori CD34, CD133 e VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*) (76). Esse vengono mobilizzate nel sangue periferico in risposta ad un evento ischemico o ad un danno a livello

endoteliale, per la costituzione di nuovi vasi o per promuovere la riparazione di quelli già esistenti (76) (77), essendo capaci di differenziare in cellule endoteliali mature; sono pertanto denominate PROGENITORI DI CELLULE ENDOTELIALI (*Endothelial Progenitor Cells*, EPC) (76) (78). La prima descrizione dettagliata dell'isolamento di un putativo progenitore endoteliale risale al 1997 (79): cellule CD34⁺ furono isolate dal sangue periferico umano e piastrate su superfici rivestite di fibronectina; dopo pochi giorni di coltura queste cellule iniziavano a manifestare caratteristiche riconducibili a quelle delle cellule endoteliali (80) (81).

La cellula staminale ematopoietica e la EPC condividono una serie di determinanti antigenici come VEGFR-2, Tie-2, c-Kit, Sca-1, CD133 e CD34, suggerendo pertanto la possibile origine di queste due popolazioni da un precursore comune, denominato emangioblasto (82) (83). Il termine "EPC" può perciò raggruppare un insieme di cellule a diversi stadi differenziativi, che vanno dall'emangioblasto alla cellula endoteliale matura (77). I segnali che danno inizio alla differenziazione dell'emangioblasto, sia verso il precursore ematopoietico che verso EPC, sono ad oggi ancora largamente sconosciuti, ma si ritiene possano includere fattori di crescita angiogenetici reclutati dalla periferia, quali ad esempio il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (84) (85).

Come illustrato, le EPC sono caratterizzate sostanzialmente dall'espressione di tre markers, CD133, CD34 e VEGFR-2, chiamato anche KDR (*Kinase Insert Domain Receptor*) o Flk-1. È stato tuttavia dimostrato che il fenotipo di tali cellule si modifica a seguito del passaggio dal midollo osseo al circolo periferico: in particolare è stata dimostrata l'acquisizione di un elevato livello di espressione della caderina endoteliale vascolare (VE-caderina) e del fattore di von Willebrand (vWF), non evidenziabile ad uno stadio precoce (86), in associazione alla perdita

dell'espressione di CD133. Dato che le cellule endoteliali mature mostrano un elevato livello di espressione di VEGFR-2, della VE-caderina e del vWF, sembra che la perdita dell'espressione in membrana di CD133 rifletta la trasformazione delle EPC circolanti in cellule endoteliali con fenotipo più maturo. È comunque ancora poco chiaro quale sia il momento nel quale le EPC iniziano a perdere il CD133, se durante la loro migrazione dal midollo osseo verso la circolazione sistemica o più tardi, durante la loro permanenza nel sistema circolatorio (76).

L'approccio sperimentale applicato con successo sul midollo osseo è stato poi esteso ad un'ampia serie di tessuti adulti (87), consentendo l'identificazione di ulteriori popolazioni staminali a livello del sistema nervoso centrale, del muscolo scheletrico, della cute, dell'apparato digerente, della cornea, della polpa dentaria, della retina e del fegato.

Nel SISTEMA NERVOSO CENTRALE, per lungo tempo considerato incapace di rigenerazione e di recupero funzionale, soprattutto a causa della sua estrema specializzazione, sono state identificate cellule staminali capaci di neurogenesi in particolari regioni cerebrali, quali il giro dentato dell'ippocampo (*Subgranular Zone*, SGZ) e la regione subventricolare (*Subventricular Zone*, SVZ) dei ventricoli laterali (31) (88), inizialmente nel topo ed in seguito anche nell'uomo (89). Le cellule staminali neuronali (*Neural Stem Cells*, NSC) sono identificabili come cellule CD133⁺/CD24^{low} e possono essere propagate in colture *serum-free* per lungo tempo in presenza di EGF (*Epidermal Growth Factor*) e di bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). In queste condizioni di coltura, le NSC mostrano le capacità di formare delle "neurosferi" dalle quali si differenziano neuroni, astrociti ed oligodendrociti (90) (91). Diversi studi hanno dimostrato che le NSC murine sono capaci di determinare un recupero funzionale di alcuni compartimenti cerebrali, come la *substantia nigra*,

caratterizzata dalla presenza di cellule dopaminergiche. Inoltre, queste cellule hanno favorito la rimielinizzazione ed il conseguente recupero funzionale di aree del sistema nervoso centrale di topi affetti da una malattia demielinizzante indotta sperimentalmente (90) (91).

Recentemente inoltre è stato dimostrato che queste cellule sono dotate di una estrema plasticità. Cellule staminali neuronali prelevate da un topo adulto e inoculate in topi sottoposti ad irradiazione corporea sub-letale, sono in grado di integrarsi nel midollo osseo e di cambiare completamente il proprio fenotipo, acquisendo le caratteristiche di HSC (92). Questo processo di conversione neuro-ematopoietica è stato successivamente dimostrato, sia *in vivo* che *in vitro*, usando anche NSC umane (93). Quest'ultime sono risultate, in un recente studio, in grado di produrre anche cellule di muscolo scheletrico, sia *in vivo* che *in vitro* (94).

Nel MUSCOLO SCHELETRICO sono state identificate due popolazioni di cellule staminali miogeniche: le cellule satelliti e la “*side population*”.

Le cellule satelliti costituiscono meno del 5% della cellularità presente nel muscolo scheletrico, si localizzano in stretta vicinanza delle fibre muscolari, tra il sarcolemma e la lamina basale, e sono le principali responsabili della rigenerazione del muscolo, sia durante la crescita che durante i processi di rigenerazione. Le cellule satelliti sono caratterizzate dall'espressione del marker di superficie M-caderina e del fattore di trascrizione Pax7 (95). Esse non sono normalmente in divisione, ma possono essere indotte a proliferare a seguito di un danno o quando il muscolo viene sottoposto ad uno sforzo eccessivo, originando precursori miogenici che poi differenziano a miofibrille. È nota l'esistenza di un gruppo di fattori di regolazione miogenica (*Myogenesis Regulation Factors*, MRF) (96) che giocano un ruolo importante durante la differenziazione di queste cellule: queste molecole non risultano espresse a

livelli significativi nelle cellule satelliti quiescenti ma subiscono un rilevante incremento di produzione quando tali cellule sono attivate, ad esempio in conseguenza di un danno. Le cellule satelliti isolate dal muscolo scheletrico di ratto, coniglio e uomo mostrano *in vitro* l'abilità di differenziare in diversi tipi cellulari di origine mesodermica: muscolo scheletrico, osso, tessuto adiposo, cartilagine e cellule del midollo osseo (97).

La “*side population*” (98) si identifica, invece, ad un'analisi citofluorimetrica (FACS) come una popolazione di cellule a più bassa intensità di fluorescenza rispetto alle altre, dopo somministrazione del colorante vitale Hoechst 33342.

Nel FEGATO, le cellule responsabili della rigenerazione dell'organo comprendono gli epatociti, implicati soprattutto nel mantenimento dell'integrità in risposta ai fisiologici processi di usura e di senescenza, e le cellule “ovali” (dette anche cellule progenitrici epatiche), identificate per la prima volta in un modello sperimentale di ratto come cellule capaci di riparare un danno da necrosi peri-portale indotta chimicamente (99). Queste cellule, ritenute responsabili soprattutto della risposta rigenerativa ad un danno cronico, sono localizzate nel contesto dell'albero biliare intra-epatico e sono capaci di differenziare, se opportunamente stimolate, sia in epatociti che in cellule epiteliali biliari (31).

Cellule staminali sono state identificate anche nel TESSUTO ADIPOSO (100) ed in particolare, nel lipoaspirato che viene normalmente raccolto durante interventi di chirurgia estetica. Queste cellule, definite cellule PLA (“*processed lipoaspirate*”), sono facilmente isolabili e sono in grado di andare incontro ad adipogenesi, condrogenesi e miogenesi *in vitro*.

Anche a livello dei tessuti epiteliali sono state identificate cellule staminali residenti. Nell'INTESTINO TENUE le cellule staminali si trovano alla base di invaginazioni

dell'epitelio definite cripte di Lieberkühn e sono in grado di auto-rinnovarsi e dare origine a precursori che migrano verso l'apice dei villi, differenziando in cellule epiteliali intestinali con funzione di assorbimento o secrezione (101). Esistono evidenze circa l'esistenza di cellule staminali anche in altri distretti del tratto digestivo, come l'esofago e lo stomaco, mentre è ancora discussa l'esistenza di una popolazione di cellule staminali nel pancreas (31).

Le cellule staminali della CUTE sono localizzate negli strati basali dell'epidermide, a diretto contatto con la membrana basale, e sono caratterizzate sia dal profilo proliferativo che dall'espressione di alcuni marcatori, tra cui la β 1-integrina. È inoltre ormai accertato che il follicolo pilifero, ed in particolare la regione del bulbo, costituisce una regione ricca di cellule staminali, perciò definite cellule “*bulge*”; tali cellule sono quiescenti in condizioni fisiologiche, mentre proliferano e differenziano durante il processo di rigenerazione e in seguito ad un danno (102).

A discapito di quanto fino a poco tempo fa ipotizzato, anche il CUORE sembra costituire una fonte di cellule staminali. In particolare, nel topo cellule staminali cardiache sono state individuate in differenti nicchie in associazione a cellule progenitrici capaci di differenziamento in cardiomiociti, cellule endoteliali o cellule muscolari lisce (103) (104). Queste cellule risultano positive per i markers c-kit, Sca-1 e MDR-1, sono dotate di clonogenicità e si sono dimostrate in grado di riparare il tessuto miocardico a seguito di un danno ischemico (105). Anche nell'uomo è stata identificata una popolazione di cellule con caratteristiche comparabili, positiva per i markers CD34, c-kit, CD31 e KDR, formante colonie *in vitro* e capace di differenziare in cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce dopo trapianto ortotopico in topi SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) affetti da infarto miocardico acuto (106) (107).

Nell'OCCHIO i processi rigenerativi conseguenti a danni estesi sono sostenuti da cellule localizzate a livello del limbo, un anello di tessuto situato tra la cornea e la congiuntiva, a seguito di una migrazione centripeta verso il centro della cornea stessa; ciò nonostante si ritiene che i fisiologici processi di riparazione e mantenimento siano in realtà sostenuti, in numerose specie, da una popolazione di cellule localizzate nei pressi della cornea, capaci di formare cloni ed esprimenti elevati livelli di p63, CK3 ABCG2 e α 9-integrina (108) (109), considerate cellule staminali residenti. Inoltre nella retina murina sono state descritte rare cellule pigmentate caratterizzate da proprietà fenotipiche e funzionali comparabili con quelle delle principali popolazioni di cellule staminali note, tra cui proliferazione clonale e multipotenza (110) (111).

Sono attualmente in corso numerosi studi finalizzati a confermare alcuni dati preliminari circa l'esistenza di popolazioni staminali anche in altri tessuti, sia murini che umani, tra cui l'apparato riproduttivo femminile (in particolare l'utero), il testicolo, la ghiandola mammaria, il pancreas ed il polmone (31).

Da questa rapida analisi emerge che le cellule staminali adulte non solo sono presenti in diversi organi, ma sono anche in grado, se isolate ed inserite in microambienti diversi e appropriati, di generare una moltitudine di cellule specializzate, rivelando una plasticità inaspettata, quasi simile a quella della cellula staminale embrionale. Queste osservazioni hanno, pertanto, determinato il sovvertimento di un dogma fondamentale della biologia, sulla base del quale si postulava che le cellule staminali adulte, a differenza di quelle embrionali, fossero parzialmente specializzate e che la loro multipotenza si esplicasse esclusivamente nella produzione di cellule differenziate del tessuto di appartenenza. A conferma di quanto detto, nel 1998 per la

prima volta fu dimostrato che le cellule staminali ematopoietiche potevano dare origine a cellule del muscolo scheletrico (112). Da allora più di 200 pubblicazioni hanno fortemente suggerito che le ASC possiedano capacità differenziative analoghe a quelle delle ESC. Questo fenomeno di acquisizione stabile di caratteristiche fenotipiche diverse da quelle del tessuto di origine è noto come “transdifferenziazione”. Recenti studi condotti su cellule staminali adulte di altri organi, quali il cervello, hanno messo in luce che la capacità di transdifferenziare in cellule mature di altri tessuti si estende anche agli organi con origine embrionale diversa (113).

Da tutte queste osservazioni si può dedurre che la predeterminazione delle cellule staminali adulte non sia irreversibile. Esse, infatti, se esposte a stimoli ambientali diversi, possono riattivare un programma genetico reso precedentemente silente ed acquisire un'identità morfologica e funzionale molto diversa da quella tessuto-specifica programmata durante la vita intrauterina (114). Almeno tre diversi meccanismi potrebbero essere in grado di spiegare questo comportamento “plastico” delle cellule staminali adulte. In primo luogo, è noto che ASC di un organo si possono trovare anche al di fuori di esso. Ad esempio, le HSC non risiedono solo nel midollo osseo, ma circolano anche nel sangue periferico e sono state isolate anche nel muscolo (57) (114). In secondo luogo, una plasticità apparente può risultare da un processo di fusione tra cellule del donatore e cellule del ricevente (fenomeno di eterocariosi). Nel 2002, Ying e Terada hanno dimostrato (113) che una coltura di ESC con HSC o NSC può portare alla formazione di cellule fuse tetraploidi o aneuploidi che si comportano come le embrionali, producendo corpi embrioidi *in vitro* ed animali chimera *in vivo*. Comunque, ancora non è noto quanto di questa apparente plasticità sia dovuto al fenomeno della fusione e quanto al fenomeno della

transdifferenziazione (113) (57) che rappresenta la terza possibilità. La transdifferenziazione è un fenomeno di acquisizione stabile di caratteristiche fenotipiche diverse da quelle del tessuto di origine, che si può estendere anche a tessuti con origine embrionale diversa. Pertanto, si può dedurre che la predeterminazione delle cellule staminali somatiche non sia irreversibile, ma che le cellule possano riprogrammarsi geneticamente dopo l'esposizione a stimoli ambientali diversi.

1.2

LE CELLULE STAMINALI RENALI

Il rene condivide con la maggior parte degli organi la capacità di rigenerare le strutture di cui è costituito sottoposte a diversi tipi di danno (115) (116) (2) (117) (3) (118).

Nella maggior parte dei tessuti adulti, il mantenimento della fisiologica omeostasi ed i processi di riparazione e sostituzione delle cellule danneggiate o morte sono sostenuti dalle cellule staminali residenti (115) (25), la cui prima descrizione, come noto, è stata fornita dallo studio del midollo osseo. Basandosi sulle acquisizioni ottenute sul sistema ematopoietico, è stato poi possibile identificare in molti altri tessuti adulti cellule staminali dotate delle proprietà di auto-rinnovamento e multipotenza, offrendo in tal modo la possibilità di comprendere i meccanismi che regolano le capacità rigenerative dei tessuti.

Tuttavia, nel rene l'identificazione delle cellule staminali ha presentato notevoli difficoltà (119) (120) (121) (122) (123) (124) (20): è stato infatti proposto che la riparazione delle strutture soggette al danno potesse essere sostenuta da quattro meccanismi (Figura 4), non necessariamente mutuamente esclusivi e più probabilmente cooperanti:

1. cellule terminali completamente differenziate sarebbero in grado di proliferare e produrre cellule figlie identiche a loro stesse.
2. cellule terminali completamente differenziate andrebbero incontro ad un processo di de-differenziazione, cui seguirebbe un nuovo differenziamento in diverse linee cellulari.

3. cellule staminali e precursori di origine extra-renale (in particolare ematopoietica) sarebbero reclutati nel rene danneggiato per differenziare in più tipi di cellule mature o in un solo tipo cellulare.
4. cellule staminali multipotenti residenti nel rene sarebbero in grado di generare tutti i tipi cellulari necessari per il ripristino dell'integrità del nefrone.

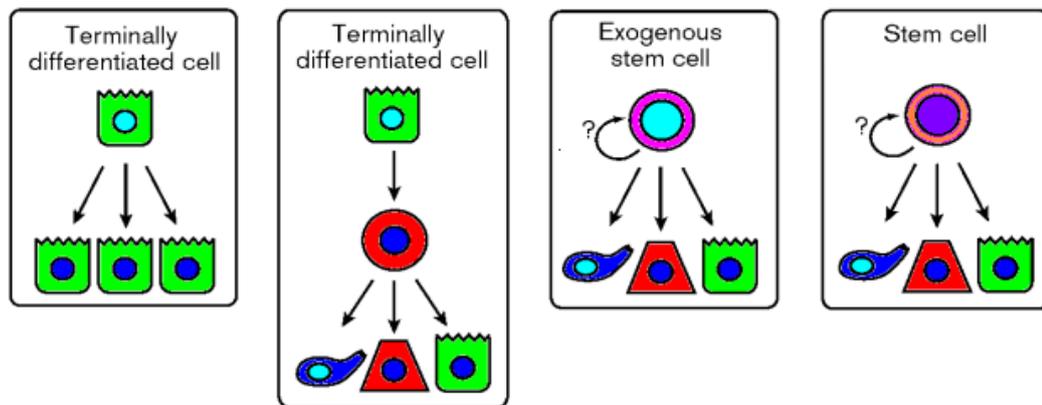


Figura 4. Possibili meccanismi coinvolti nel processo di rigenerazione renale. Modificato da Oliver JA, *Curr Opin Nephrol Hypertension*,2004;13:17–22

Nonostante l'estrema complessità anatomica e funzionale dell'organo, e nonostante la conseguente difficoltà nello studio del contributo dei singoli processi ai meccanismi rigenerativi, l'opinione attualmente più accreditata è che il recupero dell'integrità e della funzionalità renale sia determinato dalla proliferazione di cellule endogene renali (125). Alla luce delle evidenze sperimentali acquisite più recentemente, infatti, si è ormai abbastanza certi che anche nel rene esista una nicchia di cellule staminali multipotenti. A differenza, però, dell'epitelio dell'intestino e dell'epidermide, che dispongono di un compartimento proliferativo ben distinto, a livello renale risulta difficile circoscrivere la zona in cui queste cellule risiedono e determinarne con certezza l'origine.

I primi tentativi di identificare cellule staminali nel rene adulto si sono basati sull'analisi delle proprietà funzionali che caratterizzano le cellule staminali di altri tessuti, come una proliferazione cellulare lenta e continua (che conferisce la caratteristica di *label-retaining cells*), la capacità di estrudere il colorante fluorescente Hoechst (*side population cells*) (67), la capacità di crescita e replicazione in condizioni di coltura selettive e l'espressione di markers individuati in altri tipi di SC o nel rene, durante il suo sviluppo embrionale (119) (120) (123).

Ad esempio, Olivier *e coll.* (119) hanno suggerito l'esistenza di una popolazione di cellule staminali localizzata a livello dell'interstizio della papilla nel rene di ratto adulto, caratterizzata dalla ritenzione del nucleotide marcato bromodesossipurina (BrdU): tale molecola è incorporata nel DNA delle cellule durante la fase S del ciclo cellulare e pertanto cellule con un basso tasso replicativo, come le cellule staminali, mantengono una concentrazione sufficientemente elevata di BrdU da permettere la loro identificazione (*label-retaining cells*), mentre le cellule che vanno incontro a divisioni cellulari multiple diluiscono il segnale tra le cellule figlie, impedendone la rilevazione. L'identificazione di tali cellule suggerisce, in accordo con dati derivati da altri studi (120) (121), l'ipotesi che cellule di origine extra-tubulare localizzate nell'interstizio siano in grado di superare la membrana basale dell'epitelio tubulare, integrarsi nel tubulo e contribuire alla sua rigenerazione. Poiché però la proprietà di trattenere la BrdU è stata ripetutamente indicata come non specifica per l'identificazione di SC, in quanto dati sperimentali ottenuti in uno studio di alcuni anni fa, ripetutamente confermati, hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule BrdU-positive sono in realtà cellule differenziate (126) (127), gli studi successivi hanno utilizzato metodi più sofisticati: in particolare Humphreys *e coll.* (128) hanno allestito un modello di topo transgenico per il regolatore trascrizionale

homeodomain Six-2, con il quale è stato possibile identificare con certezza l'origine delle cellule responsabili della rigenerazione tubulare. In questo modello l'attivazione trascrizionale del promotore di Six-2 conduce alla produzione di una proteina di fusione tra la proteina fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) e la ricombinasi Cre, espressa solo transitoriamente dai precursori epiteliali renali durante la nefrogenesi embrionale. Nessuna espressione di GFPCre è stata evidenziata invece nell'adulto, né in condizioni fisiologiche né a seguito di un danno. Quando i topi Six-2-GFPCre sono stati incrociati con un ceppo dotato di una sequenza floxed STOP, la rimozione della sequenza di stop dipendente dall'attività di Cre ha generato nella progenie un'espressione costitutiva ed ereditabile di un gene marker, così che tutte le cellule epiteliali renali di derivazione mesenchimale, dalle cellule della capsula di Bowman a quelle della giunzione tra segmento di connessione del tubulo e dotti collettori, risultavano marcate in modo ereditabile, in contrasto con l'intero compartimento interstiziale e i dotti collettori. Dopo l'induzione di un danno renale acuto, la riparazione dei nefroni risultava sostenuta da cellule localizzate nella corticale GFP-positive, che rappresentano la progenie dei progenitori embrionali renali esprimenti Six-2. Al contrario, una diluizione del segnale avrebbe suggerito un'origine interstiziale delle cellule responsabili della rigenerazione tubulare. Questi dati, associati a quelli ottenuti da alcuni studi successivamente condotti (129) (130), hanno consentito di dimostrare che la riparazione di un danno dell'epitelio tubulare renale è sostenuta da cellule epiteliali tubulari mature residenti o da un subset di cellule staminali/progenitori localizzati a livello del nefrone, mentre il contributo di cellule di diversa provenienza, come ad esempio l'interstizio papillare, è irrilevante (131) (132) o da stabilire (119) (120) (123) (128) (129) (130).

Studi recentemente effettuati sull'uomo hanno condotto all'identificazione di una popolazione di cellule staminali/progenitori localizzata nella capsula di Bowman (20). Tali cellule sono state inizialmente individuate nel contesto del tessuto renale tramite lo studio dell'espressione dei marcatori CD24, una molecola di superficie precedentemente utilizzata per identificare altri tipi di cellule staminali umane, e CD133, un marker di HSC e di altri tipi di ASC: la contemporanea espressione di entrambe le molecole ha consentito di individuare una popolazione di cellule epiteliali parietali selettivamente localizzata al polo urinario della capsula di Bowman, successivamente isolata e caratterizzata per la mancata espressione di marcatori specifici di *lineage*, per l'espressione di fattori di trascrizione caratteristici delle SC multipotenti, quali Oct-4 e BmI-1, e per le proprietà funzionali caratteristiche delle cellule staminali, quali self-renewal, elevata efficienza clonogenica e potenziale multidifferenziativo (possono essere indotte a differenziare verso vari tipi cellulari sia renali, ed in particolare cellule dell'epitelio di tubulo sia prossimale che distale, che extra-renali, come gli adipociti, gli osteoblasti o cellule che esibiscono marcatori fenotipici e proprietà funzionali dei neuroni, come è già stato descritto per altri tipi di SC adulte (133) (134)). Quando iniettate in topi SCID affetti da insufficienza renale acuta, tali cellule CD24⁺CD133⁺ hanno mostrato la capacità di rigenerare strutture tubulari di differenti porzioni del nefrone e di ridurre il danno renale sia dal punto di vista morfologico che funzionale (20).

A supporto di questi dati si trovano inoltre i risultati di studi precedenti, che hanno dimostrato che il tubulo prossimale prende origine con varie angolazioni dalla capsula di Bowman e che almeno una parte della giunzione tubulo-glomerulare presenta un'area di aspetto intermedio tra quello glomerulare e quello tubulare, con microvilli prominenti sulle cellule parietali, sia nell'uomo che in altre specie. Questo

suggerisce la possibilità che l'epitelio parietale possa essere in grado di generare strutture tubulari, in particolare durante il periodo di sviluppo e di crescita del rene, in corso di patologie o nell'invecchiamento (135) (136) (137) (138) (139).

Ciò nonostante, nella maggior parte dei casi la rigenerazione tubulare non sembra dipendere dall'attivazione di progenitori multipotenti, quanto piuttosto dalla migrazione diretta di cellule epiteliali adiacenti alla sede del danno, in analogia a quanto descritto a livello della cute (140) (141). L'epitelio tubulare è infatti dotato della capacità di auto-rigenerazione a seguito di un danno acuto e cellule epiteliali tubulari sono in grado di proliferare e migrare per sostituire cellule morte (131) (132) (142). Vogetseder *e coll.* hanno suggerito (143) (144) che la rapida risposta proliferativa dell'epitelio tubulare conseguente ad un danno derivi dalla persistenza delle cellule epiteliali tubulari nella fase G1 del ciclo cellulare da cui, se opportunamente stimolate, possono avviare i processi replicativi ed in ultima analisi la riparazione. In quest'ottica, il reclutamento delle cellule staminali/progenitori renali sarebbe richiesto soltanto nel caso in cui il danno tubulare, eccessivamente esteso o cronicamente inferto, non potesse essere riparato dalle cellule tubulari adiacenti rimaste integre.

Nonostante la grande importanza rivestita dalla dimostrazione della capacità rigenerativa delle strutture tubulari renali da parte della popolazione identificata, è noto che la maggior parte delle malattie renali causa di ESRD, tra cui ad esempio la nefropatia diabetica e diversi tipi di glomerulonefrite, è causata da una compromissione del glomerulo ed in particolare delle cellule epiteliali specializzate che rivestono il *tuft* capillare, cioè i podociti (145) (8) (5). Queste cellule svolgono infatti un ruolo chiave nel danno renale cronico, rappresentando l'elemento cellulare su cui convergono insulti di varia natura (genetici, tossici, immunologici,

emodinamici, ossidativi, etc.). La centralità del ruolo del podocita nelle malattie glomerulari è confermata dalla relazione esistente tra entità della perdita o del danno a suo carico e gravità delle lesioni istologiche e della riduzione della funzione renale ad esse connesse (Figura 5):

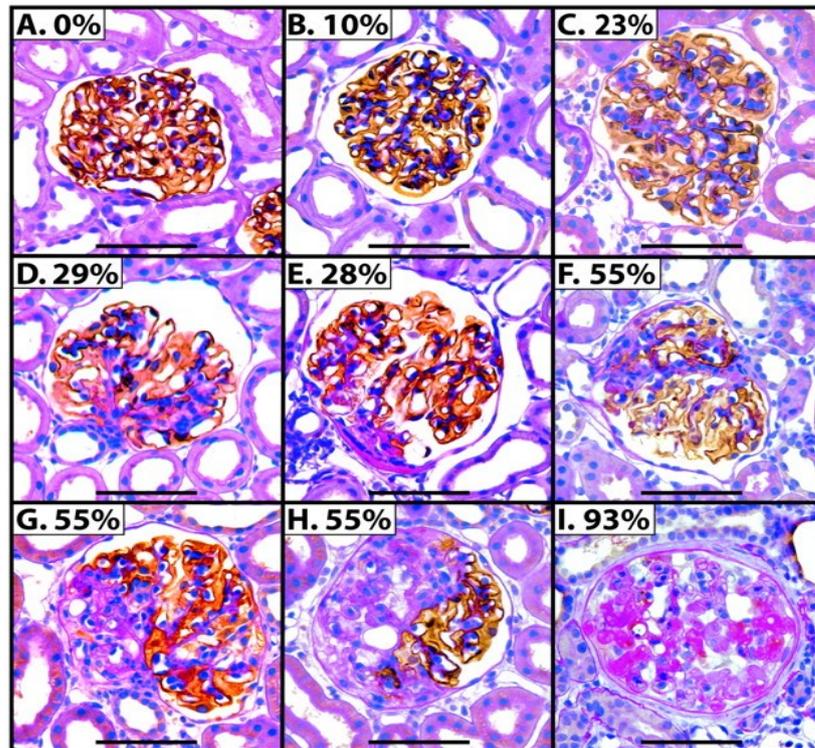


Figura 5. Correlazione tra entità del danno podocitario e gravità delle lesioni istologiche. Da (A) ad (I) progressivo aumento della perdita di podociti maturi e proporzionale incremento della sclerosi glomerulare. Wharram BL et al., *J Am Soc Nephrol*,2005;16(10):2941-52.

fin quando la perdita è limitata (inferiore al 20%) vi può essere completa *restitutio ad integrum* sia morfologica che funzionale; quando la perdita sale al 20-40% il danno esita nella formazione di una cicatrice, mentre quando è superiore al 60% i glomeruli divengono globalmente sclerotici e non filtranti. Questi stadi si accompagnano a progressivi incrementi della proteinuria (fino al range nefrosico) ed alla riduzione della funzione di clearance del rene (5).

Nonostante il podocita rappresenti una cellula altamente differenziata e post-mitotica, e quindi dotata di scarsissima capacità replicativa (5) (146), esistono evidenze di carattere sperimentale e clinico che suggeriscono che il danno podocitario può essere, almeno in parte, recuperato (117) (3). Un potenziale meccanismo di sostituzione e riparazione potrebbe essere rappresentato dal reclutamento e dalla attivazione di cellule staminali residenti nel rene.

La scoperta dei progenitori $CD24^+CD133^+$ e la loro specifica localizzazione al polo urinifero della capsula di Bowman del rene adulto, l'unica regione del nefrone in contiguità sia con le strutture tubulari che con i podociti glomerulari (123), suggeriscono che tali cellule rappresentino progenitori comuni che, a partire dalla loro sede strategica, possono raggiungere sia strutture tubulari che glomerulari, sostituendo cellule danneggiate in entrambe queste sedi.

In particolare, in accordo con studi precedenti che hanno ipotizzato l'esistenza di una popolazione di transizione con fenotipo intermedio tra cellule epiteliali parietali e podociti, localizzata al polo vascolare del glomerulo (147) (148) (149), nell'uomo è stato dimostrato che le cellule $CD24^+CD133^+$ rappresentano una popolazione eterogenea e gerarchica di progenitori, caratterizzata da una precisa e definita organizzazione tissutale e dal potenziale di differenziamento e rigenerazione di diverse strutture renali (22).

Infatti, le cellule localizzate al polo urinifero della capsula di Bowman, che esprimono elevati livelli dei marcatori di progenitori $CD24$ e $CD133$, ma che risultano negative per l'espressione dei marcatori dei podociti maturi, tra cui la podocalixina (PDX), mostrano elevata capacità clonogenica e differenziativa, sia in senso tubulare che in senso podocitario (Figura 6).

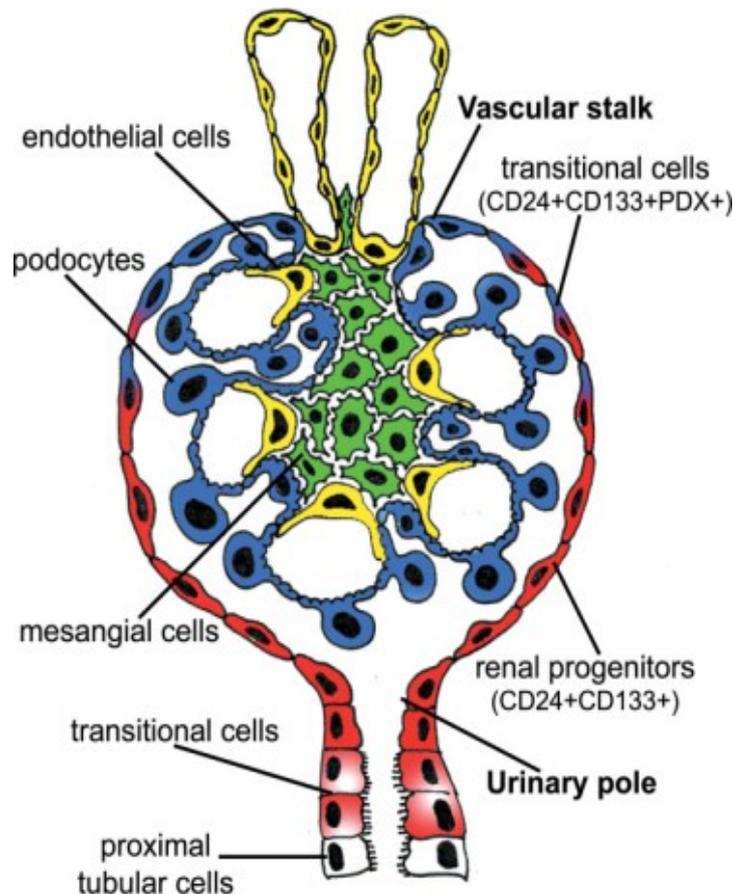


Figura 6. Distribuzione gerarchica dei progenitori renali in un glomerulo umano adulto. I progenitori $CD24^+CD133^+$ (in rosso) sono localizzati al polo urinario, in stretta contiguità con i podociti (in blu) ad un estremo e con le cellule tubulari (in bianco) a quello opposto. Una popolazione di cellule di transizione ($CD24^+CD133^+PDX^-$, rosso/blu) mostra caratteristiche intermedie tra progenitori renali (rosso) e podociti (blu) e si localizza tra il polo urinario e quello vascolare. Al polo vascolare del glomerulo la popolazione di transizione è in contiguità di cellule che mancano dell'espressione di markers di progenitori ma che risultano positive per l'espressione di quelli di podociti maturi (blu). Sono rappresentate anche le cellule endoteliali (in giallo) e le cellule mesangiali (in verde). Romagnani P, *Stem Cells*,2009;27(9): 2247-2253.

Al contrario, le cellule con localizzazione intermedia tra polo urinario e polo vascolare e caratterizzate dal fenotipo $CD24^+CD133^+PDX^+$, borderline tra quello del progenitore e quello podocitario maturo, hanno una capacità clonogenica decisamente minore, riscontrabile peraltro soltanto in mezzi inducenti il differenziamento a podociti, e sono in grado di rigenerare soltanto cellule podocitarie. Infine, le cellule localizzate al polo vascolare della capsula hanno un fenotipo simile a quello del podocita maturo ($CD133^-CD24^-PDX^+$), con cui

condividono anche caratteristiche funzionali di cellule post-mitotiche, non dando origine a cloni e potendo essere mantenute in coltura soltanto per alcuni giorni in appositi medium, in accordo con la loro natura di cellule terminalmente differenziate.

I risultati ottenuti nell'uomo sono stati confermati da esperimenti condotti parallelamente nel topo da Appel *e coll.* (150) che hanno dimostrato come una popolazione di transizione, con caratteristiche sia morfologiche che immunofenotipiche intermedie tra cellule epiteliali parietali e podociti, può essere individuata in prossimità delle diramazioni capillari del glomerulo. Dato ancor più rilevante, il tagging genetico delle cellule epiteliali parietali nel topo ha confermato in modo inequivocabile che i podociti originano da cellule dell'epitelio della capsula, che proliferano e differenziano spostandosi dal polo urinifero a quello vascolare; tale processo è particolarmente importante ed attivo durante la crescita del rene nell'infanzia e nell'adolescenza, ma può aver luogo anche a seguito di un danno che consenta una lenta e regolata generazione di nuovi podociti, come ad esempio un nefrectomia monolaterale (151).

È opinione comune che le cellule staminali e progenitrici dei tessuti adulti derivino da progenitori embrionali coinvolti nell'organogenesi durante la vita fetale (152) (153).

I nefroni, le unità fondamentali del rene, sono generati ripetitivamente durante l'embriogenesi renale da una popolazione di SC mesenchimali (Figura). In particolare, lo sviluppo del rene adulto nel mammifero deriva una reciproca interazione tra la diramazione della gemma o bozza ureterica (*Ureteric Bud*, UB), che origina dal dotto di Wolff, e il mesenchima o blastema metanefrico (*Metanephric Mesenchyme*, MM) indifferenziato circostante: i segnali provenienti dal MM

inducono la UB ad allungarsi, invadere il mesenchima circostante e ramificarsi ripetutamente, dando origine alle strutture comprese tra i dotti collettori ed il trigono vescicale del rene adulto. Contemporaneamente, in corrispondenza dei primi punti di ramificazione, alcune cellule mesenchimali si aggregano e condensano, dando inizio al processo di conversione da mesenchima ad epitelio, noto come transizione mesenchima-epitelio (*Mesenchyme to Epithelium Transdifferenzation*, MET) (154) (155), che porterà alla formazione dei glomeruli, dei tubuli distali e prossimali e delle anse di Henle, cioè i nefroni, mentre altre cellule mesenchimali genereranno lo stroma interstiziale. Gli aggregati cellulari formano dapprima una vescicola renale polarizzata e poi, in successione, le strutture conosciute come “corpo a forma di virgola” e “corpo a forma di esse”, l’estremità distale della quale, rimasta in contatto con l’epitelio della UB, si fonde a formare un singolo continuo tubulo epiteliale, le cui cellule di rivestimento iniziano ad esprimere marcatori di cellule tubulari (116) (156); l’estremità prossimale forma la matassa glomerulare, mentre le cellule endoteliali invadono l’introflessione più prossimale (Figura 7A) e, interagendo con le cellule epiteliali glomerulari derivate dal mesenchima, concorrono alla formazione della membrana basale glomerulare, una matrice altamente specializzata che costituisce la struttura per la barriera di filtrazione. La UB continua a ramificarsi e spinge i nuovi nefroni lungo l’asse radiale del rene, in modo che i nefroni che si formano per primi si localizzano più vicino alla zona midollare, mentre quelli che si formano per ultimi si localizzano nella zona nefrogenica più periferica (116). Nell’uomo tale processo si arresta immediatamente prima della nascita (117).

Numerosi ricercatori hanno suggerito che la popolazione dei progenitori renali identificata nel rene adulto abbia origine da progenitori embrionali generati durante lo sviluppo dell’organo. Nel rene embrionale, infatti, la co-espressione di CD133 e

CD24, in associazione con elevati livelli di espressione dei fattori di trascrizione Bmi-1 e Oct-4, caratterizza un subset di cellule riscontrabili nel MM, nelle vescicole renali, nei “corpi a forma di virgola” e nei “corpi a forma di esse”, dotate di auto-rinnovamento e multipotenza e della capacità di rigenerare diverse porzioni del nefrone, riducendo la necrosi e la fibrosi tissutale e consentendo il recupero funzionale del rene di topi affetti da un danno renale acuto (157) (Figura 7).

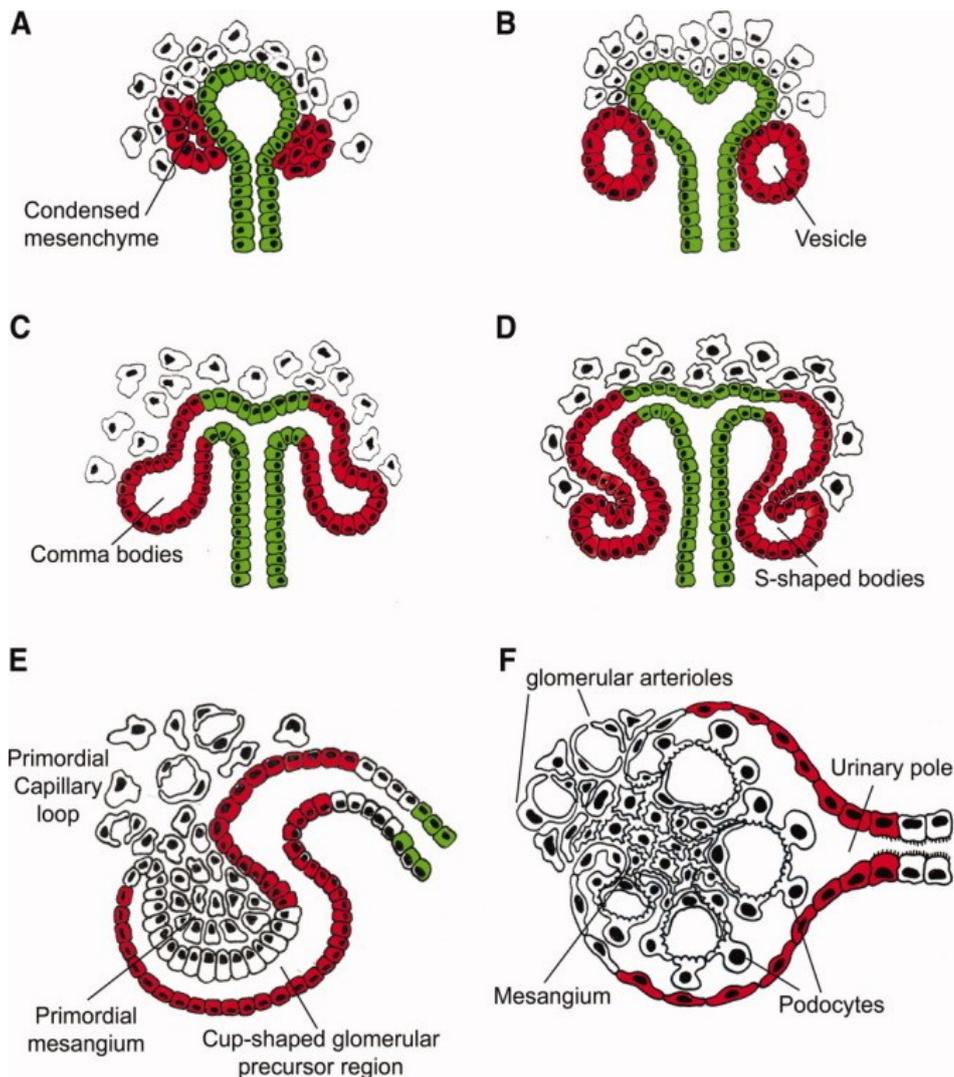


Figura 7. Serie di illustrazioni schematiche delle modificazioni morfologiche e della localizzazione dei progenitori renali CD24⁺CD133⁺ durante le diverse fasi dello sviluppo embriologico renale. Le cellule mesenchimali prossimali all'estremità delle diramazioni della UB differenziano attraverso una specifica serie di passaggi: aggregati cellulari (A), vescicola renale (B), “corpi a forma di virgola” (C), “corpi a forma di esse” (D). È mostrato anche lo sviluppo delle strutture vascolari nel contesto del glomerulo in un “corpo a forma di esse” (E) e nel glomerulo di un nefrone in uno stadio maturativo più avanzato (F). Le cellule della UB sono evidenziate in verde. I progenitori renali CD24⁺CD133⁺ sono evidenziate in rosso. *Romagnani P, Stem Cells, 2009;27(9): 2247-2253.*

Nei “corpi a forma di esse” (Figura 7D) le cellule CD24⁺CD133⁺ sono localizzate sia nell’ansa prossimale, da cui originano sia i podociti che le cellule epiteliali della capsula di Bowman, che in quella distale: quando però inizia a rendersi evidente la struttura vascolare del glomerulo, tali cellule risultano identificabili esclusivamente a livello della superficie della capsula. Successivamente, a sviluppo ultimato, le cellule si localizzano selettivamente al polo urinifero.

L’esistenza di una popolazione di cellule staminali derivante dal MM era stata già suggerita dagli studi di Reisner *e coll.* che hanno dimostrato la possibilità di ricostituire tessuto renale funzionante a partire dal MM ottenuto da reni di 8 settimane di gestazione (158). Al contrario, tessuti renali fetali ottenuti da reni di 10-14 settimane di gestazione mantengono la capacità di generare nefroni funzionanti ma con un numero di tubuli e glomeruli minore di quello ottenibile con reni di 8 settimane. In accordo con questi dati, il massimo numero di cellule CD24⁺CD133⁺ si riscontra in reni di 8-9 settimane, decresce tra la decima e la quattordicesima settimana, e si riduce a meno del 2% della cellularità renale totale nell’organo adulto (157). Gli studi condotti su topi transgenici per il regolatore trascrizionale Six-2 hanno confermato i dati precedentemente esposti (159).

Dunque, sia nel rene fetale che in quello adulto le cellule staminali CD24⁺CD133⁺ persistono come cellule epiteliali localizzate selettivamente al polo urinario della capsula di Bowman, supportando in definitiva l’ipotesi che le SC adulte derivino direttamente da quelle embrionali e che, insieme all’ambiente che le circonda, costituiscano una nicchia staminale (158) (160).

1.3

LA NICCHIA STAMINALE

Le cellule staminali sono definite attraverso le proprietà funzionali di cui godono e che le rendono costituenti essenziali dell'omeostasi tissutale. Sono infatti in grado di sostenere le esigenze di rigenerazione e sostituzione di cellule perse a causa di fisiologici processi di senescenza o di un danno. Per garantire queste funzioni durante l'arco della vita di un organismo, è necessario un delicato equilibrio tra self-renewal e differenziamento delle cellule staminali, che per questo motivo, dopo la nascita, si collocano e risiedono in un microambiente specializzato denominato "nicchia staminale", la cui natura e localizzazione variano in dipendenza del tipo di organo e tessuto considerato (161).

In architettura con il termine "nicchia" (dal latino *nidus*, nido) si intende una cavità o alveolo ottenuti nello spessore di un muro; il concetto architettonico di "luogo di residenza" della cellula staminale, ambiente fisico nel quale questa è localizzata, è però del tutto inadeguato a definire la nicchia staminale. Questo risulta dal fatto che è ormai opinione comune che il ruolo funzionale, e quindi potenzialmente anche terapeutico, delle cellule staminali non sia limitabile a loro stesse, ma vada esteso alle interazioni di queste e dei loro discendenti con l'ambiente circostante, così da creare un'unità non solo anatomica ma anche funzionale che assolve a tutte le funzioni omeostatiche e di rigenerazione/riparazione tissutali. In questo senso, una definizione di nicchia che maggiormente si avvicina al concetto di nicchia staminale è quella di nicchia ecologica, termine che indica la posizione di una specie (o di una popolazione) all'interno di un ecosistema, ossia il suo modo di vivere, il suo ruolo e

tutte le condizioni fisiche, chimiche e biologiche che ne permettono l'esistenza in quel particolare ambiente. Per definizione una nicchia ecologica esiste solo se esiste una popolazione che la occupa. La nicchia staminale può quindi essere definita come il microambiente nel quale risiedono le cellule staminali, costituito da tutti i fattori, cellulari e molecolari, che interagiscono con queste, regolandone le funzioni e presiedendo al loro mantenimento (162) (Figura).

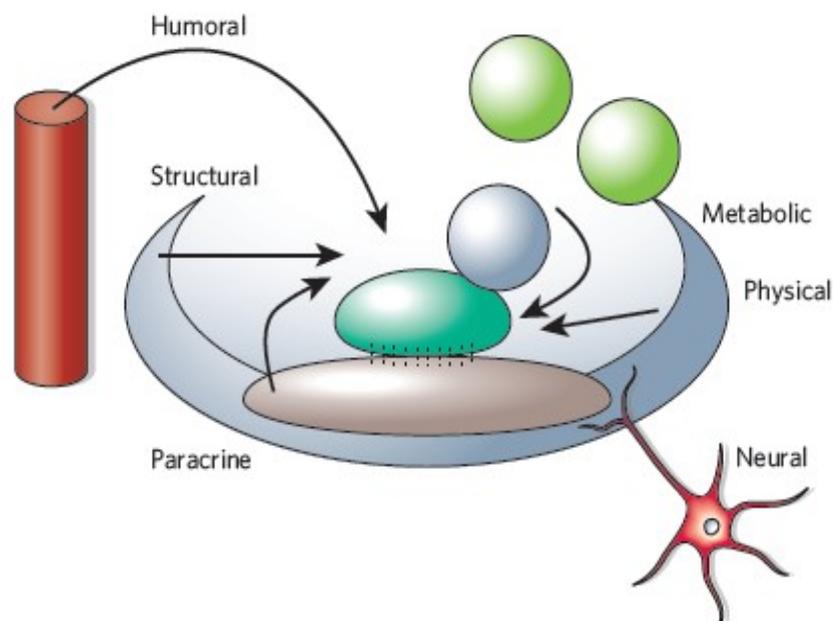


Figura 8. La nicchia staminale. Elementi del microambiente specializzato che circonda le cellule staminali e che ne modulano le proprietà: interazioni con lo spazio fisico circostante e con la membrana cellulare e le molecole di superficie di cellule adiacenti, segnali endocrini e paracrini provenienti da sorgenti locali o sistemiche, input nervosi e prodotti del metabolismo tissutale. Modificato da Scadden DT, *Nature*,2006;441:1075-79.

L'ipotesi dell'esistenza di una nicchia staminale è stata formulata per la prima volta nel 1978 da Schofield per descrivere il microambiente specializzato che circonda ed ospita la cellula staminale e che le conferisce le proprietà funzionali che questa possiede e che vengono meno se è allontanata ed isolata dalla nicchia (163). Nonostante tale concetto fosse stato inizialmente ideato in riferimento al sistema

ematopoietico del mammifero, per fornire una spiegazione sull'apparente contraddizione tra l'immortalità delle cellule staminali e le osservazioni sperimentali circa l'esistenza delle così detta "age-structure" delle unità formanti colonie (*Colony-forming Units*, CFUs) *in vivo*, le prime evidenze sperimentali in merito alla sua esistenza furono fornite da studi su modelli di invertebrati, in particolare le gonadi di *Drosophila melanogaster* (164) (165) (166) e di *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (167), in cui è stato dimostrato che le cellule staminali germinali risiedono all'estremità distale di una struttura affusolata e sono dipendenti dall'interazione con le cellule somatiche che la costituiscono, al fine di mantenere le loro caratteristiche di staminalità (167) (168). I primi risultati in merito all'identificazione di nicchie staminali in mammiferi sono derivati da studi condotti sui follicoli piliferi e sulle cripte intestinali, in cui le cellule epiteliali costituenti il microambiente specializzato circostante le cellule staminali sono state identificate sulla base delle caratteristiche cinetiche di incorporazione di marcatori di replicazione cellulare, quali BrdU e timidina triziata, distinte rispetto a quelle delle cellule staminali (169) (170). Successivamente, il miglioramento delle conoscenze delle caratteristiche strutturali e funzionali delle nicchie staminali ha permesso la loro identificazione in numerosi altri tessuti, quali il midollo ematopoietico e il sistema nervoso (161).

La mole di informazioni ottenute dal confronto tra le nicchie staminali di organismi evolutivamente diversi ha consentito di identificare alcune caratteristiche comuni che definiscono le proprietà essenziali di tutte le nicchie staminali (46) (160) (161) (162) (171) (172) (173):

1. La nicchia staminale è costituita da un insieme di cellule somatiche con disposizione spaziale e localizzazione tissutale specifiche, deputato al

mantenimento del *pool* di cellule staminali di cui quel tessuto dispone. La struttura complessiva della nicchia è variabile e diversa nei diversi tessuti ed organismi, e numerosi tipi cellulari contribuiscono alla sua costituzione: oltre alle cellule staminali infatti, nella nicchia sono presenti cellule cosiddette eterologhe (o stromali o di supporto), quali osteoblasti circostanti le HSC nel midollo ematopoietico e cellule endoteliali nel cervello, con funzione di adesione e supporto strutturale, ma coinvolte anche nella regolazione delle proprietà funzionali delle cellule staminali.

Oltre che alla componente cellulare, un ruolo sempre più significativo è attribuito ai costituenti non cellulari della nicchia staminale, quali la matrice extracellulare (*Extra-Cellular Matrix*, ECM) e proteine di membrana, proteine di secrezione con azione autocrina/paracrina e molecole non proteiche. Esistono infatti numerosi dati a supporto del possibile ruolo regolatorio svolto da costituenti della ECM, quali le β -1 integrine, che a livello cutaneo presentano un pattern di espressione selettivo sulle cellule staminali e si sono dimostrate coinvolte nella localizzazione delle stesse nell'ambiente della nicchia, attraverso l'interazione con specifici ligandi (174) (175), e nel corretto orientamento del fuso mitotico durante i processi di divisione cellulare (162), la Tenascina C, coinvolta nella modulazione delle funzioni staminali in numerose diverse nicchie, quali quella ematopoietica e del sistema nervoso (176) (177), e l'osteopondina, che contribuisce alla regolazione del numero di HSC allocate nella nicchia ematopoietica (178). Per quanto riguarda invece i fattori solubili, esistono evidenze circa il ruolo di numerose molecole quali Unpaired (UPD), ligando che attiva la via di segnalazione JAK/STAT (164) (165) (166) (nella gonade maschile),

l'omologo della BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) Decapentaplegic (DPP), che attiva la cascata di segnalazione di Smad-1, che a sua volta facilita la traslocazione nucleare del fattore di attivazione trascrizionale Medea, omologo di Smad-4 (179) (180) (181) (nella gonade femminile) e Glass bottom boat (GBB) nella stimolazione del self-renewal, nella soppressione del differenziamento e nel mantenimento delle cellule staminali nella *Drosophila* (165) (166) (180) (181) (182), mentre WNTs (*Wingless-related Proteins*), FGFs e Hedgehog (HH) presentano analoghe funzioni anche nei mammiferi (160). Infine, sempre più numerose evidenze sottolineano il coinvolgimento anche di molecole non proteiche nella regolazione delle interazioni tra cellula staminale e microambiente circostante costituente la nicchia: gli esempi più noti sono quelli dello ione calcio e delle specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), che potrebbero rappresentare i mediatori tramite i quali le modificazioni dell'ambiente tissutale modulano in tempo reale le funzioni delle cellule staminali, costituendo un sistema di controllo che consente loro di rispondere quasi istantaneamente a variazioni delle condizioni del tessuto (160).

2. La nicchia rappresenta un sistema di ancoraggio fisico per le cellule staminali, realizzato attraverso l'interazione di proteine di membrana, quali E- ed N-caderina e integrine, con la ECM (161).
3. La nicchia produce numerose molecole che agiscono sulle cellule staminali regolando, in associazione con i programmi genetici intrinseci che ciascuna presenta ed attua, il numero e il destino di tali cellule. Tra quelle note si possono ricordare HH, WNTs, BMPs, FGFs, Notch, SCF (*Stem Cell Factor*), Angiotensina-1, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) e UPD, molti dei quali

presentano, tra le altre cose, un elevato livello di conservazione lungo la scala evolutiva (161). Nel contesto della nicchia esiste un elevato livello di sovrapposizione tra questi diversi sistemi di regolazione tanto che, semplificando, numerose vie convergono sulla regolazione della stessa funzione, quale il self-renewal o il differenziamento, ed al contrario un singolo fattore solubile può influenzare, tramite l'interazione con diversi sistemi recettoriali e di trasduzione del segnale, diverse funzioni cellulari. La complessità, al momento peraltro soltanto ipotizzabile nella maggior parte dei sistemi staminali studiati, soprattutto nel mammifero, di tale sistema evidenzia come il mantenimento e l'espressione di proprietà delle cellule staminali critiche per l'omeostasi tissutale richieda una fine regolazione di tale insieme di segnali (160).

4. Sia negli invertebrati che nei mammiferi le nicchie staminali presentano una struttura asimmetrica, che consente l'espletamento di una modalità di divisione cellulare, la divisione asimmetrica appunto, finalizzata alla contemporanea genesi di una cellula indirizzata al differenziamento e di una cellula che, mantenendo tutte le caratteristiche di staminalità della cellula madre da cui origina, mantiene intatto il *pool* di cellule staminali del tessuto (161) (162).

Considerate nel complesso, pertanto, le funzioni della nicchia staminale comprendono (46) (160) (161) (162) (171) (172) (173):

1. Adesione e compartimentalizzazione delle cellule staminali.
2. Mantenimento delle cellule staminali allo stato indifferenziato. Nella *Drosophila* è stato dimostrato che il fattore solubile UPD, secreto dalle cellule somatiche che costituiscono il fulcro (*Hub*) della nicchia, svolge

questa funzione, così che solo le cellule staminali in contatto con questa struttura conservano le loro caratteristiche di staminalità; durante la divisione asimmetrica soltanto la metà delle cellule generate resta in contatto con il fulcro, mentre l'altra metà è spazzata dall'ambiente della nicchia e perciò costretta ad avviare il processo differenziativo (165) (166) (183). Nel verme *C. elegans* manca l'evidenza della divisione asimmetrica delle cellule staminali germinali ed è stato dimostrato che il loro mantenimento è ottenuto tramite l'interazione del sistema di segnalazione GLP-1/Notch, i cui costituenti recettoriali sono espressi dalle cellule staminali, con il ligando Lag-2, espresso sulle cellule dell'estremità distale della nicchia nelle gonadi del verme: tale interazione risulta nella promozione della proliferazione mitotica e nella soppressione del differenziamento, che in queste cellule corrisponde all'ingresso in meiosi (153) (184) (185).

I meccanismi deputati a tale funzione non sono altrettanto ben conosciuti nei mammiferi, per i quali la maggior parte delle informazioni sono state ottenute dallo studio sulla nicchia che accoglie la cellula staminale ematopoietica: la chemochina CXCL12 (o *Stromal Cell-Derived Factor-1*, SDF-1), ad esempio, è richiesta per il mantenimento delle cellule staminali ed è espressa sia dagli osteoblasti endosteali che dalle cellule perivascolari, che si pensa rappresentino i principali costituenti della nicchia insieme alle HSC. Analoghi risultati sono stati ottenuti dallo studio dell'Angiopoietina-1. Ciò nonostante, allo stato attuale delle conoscenze, non sembra che nessuno di questi fattori sia indispensabile nella regolazione di questa proprietà della nicchia staminale e non è chiaro quali siano le reali fonti di produzione dei fattori studiati. Una situazione analoga si delinea in altre nicchie staminali di

mammifero, quali il follicolo pilifero e la zona subventricolare del proencefalo, nei quali sono stati identificati alcuni fattori deputati a tale funzione, ma non le cellule che li producono (25) (186).

3. Realizzazione della divisione asimmetrica della cellula staminale attraverso l'orientamento del fuso mitotico: tale tipologia di divisione cellulare "polarizzata" consente alle due cellule figlie generate di andare incontro a differenti destini, ovvero il mantenimento per una e il differenziamento per l'altra, come risultato di una diversa interazione con aree del microambiente circostante. Non è chiaro se questo meccanismo, dimostrato nella *Drosophila* (183), sia attuato anche nelle nicchie staminali dei mammiferi.
4. Mantenimento numerico del *pool* di cellule staminali di un tessuto: questo obiettivo è ottenuto in parte attraverso i diversi processi replicativi cui le cellule staminali vanno incontro, con specifiche differenze circa le capacità di attuazione in relazione al tipo specifico di cellula staminale e di nicchia considerata, in parte attraverso la protezione delle cellule staminali da stimoli differenziativi, apoptotici o di altro tipo, che potrebbero depletare il *pool* staminale (171). Un ulteriore possibile meccanismo coinvolto è il de-differenziamento, descritto nella nicchia staminale delle cellule staminali germinali della *Drosophila*: la modulazione dell'espressione di alcuni fattori solubili, deputati alla regolazione dell'equilibrio tra self-renewal e differenziamento, si è dimostrata in grado di provocare il ripopolamento della nicchia stessa, attraverso la riacquisizione del fenotipo staminale da parte di cellule già avviate al processo differenziativo (187) (188) (189).
5. Mantenimento della quiescenza: per motivi non del tutto chiari molte cellule staminali del mammifero richiedono periodi intermittenti di quiescenza per il

loro mantenimento. Ad esempio nel topo la quiescenza delle HSC dipende da fattori solubili prodotti dal microambiente midollare, quali Steel, CXCL12, Trombopoietina e Angiopoietina-1, tanto che la perdita della loro azione, per mancata produzione o mancata interazione con i sistemi recettoriali deputati, determina la proliferazione delle HSC e la deplezione del *pool* staminale (36). All'estremo opposto, una perdita del delicato equilibrio tra quiescenza e proliferazione cellulare può risultare in una proliferazione incontrollata della cellula staminale e dei progenitori che da questa originano, che potrebbero risultare in ultima analisi nella genesi di neoplasie (171) (190).

6. Modulazione di segnali sistemici che influenzano le funzioni della cellula staminale: è noto che il self-renewal può essere modulato anche da stimoli provenienti da siti distanti rispetto al microambiente della nicchia, cioè stimoli di provenienza sistemica, rappresentati ad esempio da ormoni, citochine e stimoli nervosi (36) (160) (161) (162). L'attività delle cellule staminali può essere modulata da stimoli sistemici anche in modo indiretto, ossia attraverso il filtro offerto a questi dalla nicchia staminale: un esempio di ciò è rappresentato dalla mobilizzazione delle HSC dal midollo osseo, sia in condizioni fisiologiche che in risposta ad un evento patologico che comporti l'incremento di tale necessità. Numerose citochine, quali G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) e IL-18 sono in grado di modificare drammaticamente il numero di HSC in circolo, aspetto questo ben noto e sfruttato con finalità terapeutiche in ematologia, attraverso l'interazione con le componenti della nicchia: ad esempio G-CSF è in grado di modificare la produzione di CXCL12 da parte degli osteoblasti (191). Anche il sistema

nervoso sembra coinvolto in questo tipo di regolazione, tanto da essere oggi considerato come un mezzo attraverso il quale le cellule staminali sono rese capaci di avvertire i cambiamenti nello stato di un tessuto o di un intero organismo, così che qualsiasi modificazione, come ad esempio un danno, genera una adeguata risposta nel sistema staminale deputato. Un ulteriore dato a supporto dell'importanza della regolazione sistemica delle funzioni delle cellule staminali è rappresentata dalla frequente localizzazione delle cellule staminali, e più in generale delle nicchie, nei pressi di strutture vascolari che servono il tessuto. È noto infatti che durante lo sviluppo embrionale di numero diversi organi, quali pancreas, cuore, cervello, fegato, surrene ed osso, le cellule endoteliali e la popolazione dei precursori co-localizzano nel contesto del tessuto e dell'organo nascente (192).

1.3.1 PRINCIPALI NICCHIE STAMINALI IDENTIFICATE

Drosophila melanogaster. La nicchia in cui sono localizzate le cellule staminali germinali è stata studiata approfonditamente ed è oggi conosciuta in molti dei dettagli strutturali, di organizzazione e funzionamento che la caratterizzano. Risulta costituita da un complesso di cellule di supporto, le cellule del fulcro (*Hub*) nel testicolo (165) e quelle del cappuccio (*Cap*) nell'ovaio (164), oltre che dalla popolazione staminale (Figura 9a). La struttura di questa nicchia staminale è strettamente connessa con i meccanismi di interazione cellula-cellula e di comunicazione tra i diversi elementi che la costituiscono ed è pertanto fondamentale nel regolare la divisione simmetrica o asimmetrica delle cellule staminali germinali.

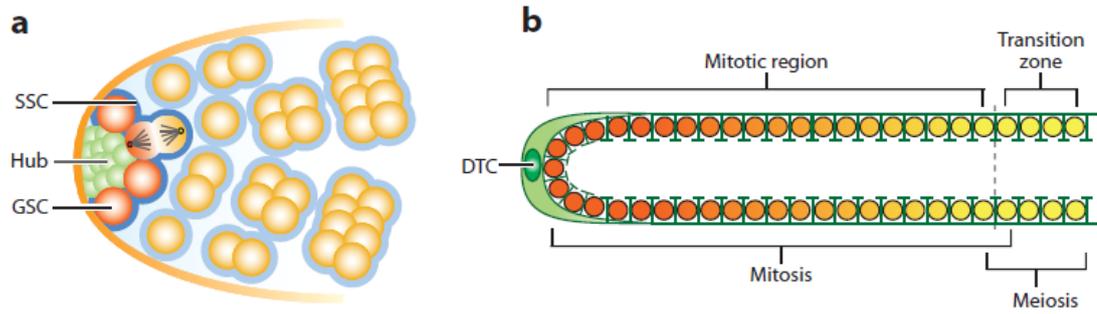


Figura 9. (a) Nicchia staminale della gonade maschile di *Drosophila*. Le cellule staminali germinali (GSCs) sono ancorate al fulcro (Hub), le cui cellule producono molecole che modulano il differenziamento delle GSCs. L'orientamento del fuso mitotico rispetto alla nicchia determina il tipo di divisione cellulare cui le GSCs vanno incontro, così che la cellula staminale si divide asimmetricamente per generare una cellula figlia che mantiene le caratteristiche di staminalità ed un'altra che è allontanata dalla nicchia e indotta a differenziare. (b) Nicchia staminale germinale di *Caenorhabditis elegans*. Modificato da Moore KA et al, *Science*, 2006;311:1880-85.

Caenorhabditis elegans. Sia nel maschio che nell'ermafrodita, il mantenimento dell'identità staminale ed il controllo differenziale della mitosi e della meiosi delle cellule staminali germinali sono regolati da un singolo tipo cellulare denominato *distal tip cell* (DTC), la cui perdita provoca appunto l'arresto della replicazione mitotica e l'ingresso in meiosi, e quindi il differenziamento, delle cellule staminali (193) (Figura 9b). La DTC fornisce alle cellule staminali germinali sia il supporto fisico che i fattori solubili necessari allo svolgimento delle loro funzioni, tanto che la nicchia che concorre a costituire è attualmente considerata un esempio pressoché unico di nicchia staminale costituita da un unico elemento cellulare non staminale.

Sistema nervoso. Nel cervello dei mammiferi sono state descritte due nicchie, una nella zona subventricolare, meglio caratterizzata, e l'altra nella zona subgranulare. Le cellule staminali neuronali, isolate soprattutto dalla prima nicchia, hanno dimostrato la capacità di differenziare *in vitro* sia in cellule neuronali che in cellule della glia (194). Lo studio dei meccanismi coinvolti nel mantenimento e nella regolazione di

questa nicchia staminale ha evidenziato come un importante sistema sia rappresentato, in analogia alla nicchia staminale della *Drosophila*, dall'orientamento del fuso mitotico rispetto alle strutture circostanti, in particolare i ventricoli, attraverso il quale viene determinato il tipo di divisione cellulare, simmetrica o asimmetrica, cui le NSC vanno incontro. Molta attenzione è rivolta alla chiarificazione della relazione esistente in questa nicchia tra NSC e strutture vascolari: è stato infatti dimostrato che le NSC hanno la capacità di differenziare in cellule endoteliali, suggerendo di essere in grado di generare le componenti che costituiscono la nicchia stessa in cui sono accolte (195). Allo stesso tempo sono ottenute sempre maggiori evidenze circa il ruolo delle cellule endoteliali come possibili sorgenti di fattori di crescita, quali ad esempio VEGF, e di regolazione delle funzioni delle NCS (196). Un altro costituente della nicchia sembra inoltre essere rappresentato dagli astrociti (197) (198).

Epidermide. L'epidermide accoglie due diverse nicchie staminali, l'una che mantiene e regola le cellule staminali che sono responsabili dell'omeostasi dell'epidermide stessa, e l'altra rappresentata dal follicolo pilifero. Le cellule staminali epidermiche sono localizzate nelle unità di proliferazione epidermica nello strato basale della cute (199), mentre quelle del follicolo pilifero risiedono nella regione del bulbo, dalla quale sono attivate durante il ciclo cellulare o in risposta ad un danno (200). Nella nicchia staminale dell'epidermide un elemento importante di regolazione funzionale sembra essere rappresentato dalla membrana basale e dal contatto che le cellule staminali intraprendono con questa, tanto da determinare, grazie ad un'espressione differenziale della molecola di superficie $\beta 1$ integrina, l'orientamento del fuso mitotico e pertanto il tipo di divisione cellulare cui le cellule staminali vanno

incontro (174) (175) (201). Le cellule staminali che risiedono nella regione del bulbo del follicolo pilifero sono tipicamente quiescenti, ma possono avviare processi replicativi in risposta ad insulti traumatici o durante il normale svolgersi del ciclo del capello (202) (Figura 10A). Sono numerosi gli studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono il funzionamento di tali nicchie.

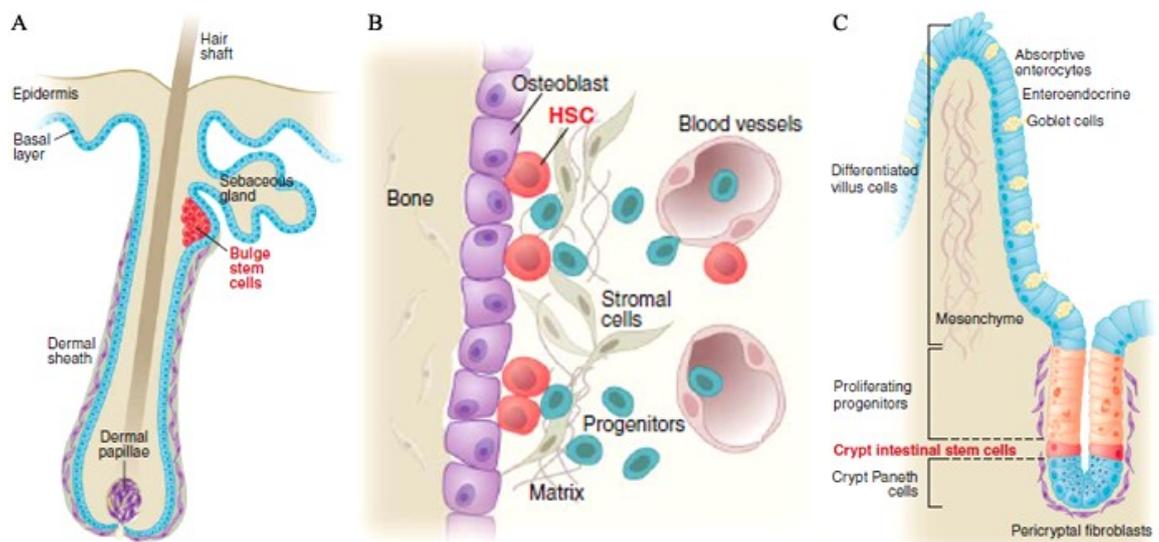


Figura 10. Le nicchie staminali del follicolo pilifero (A), del midollo osseo (B) ed intestinale (C) e le loro cellule staminali (in rosso). Modificato da Moore KA et al, Science,2006;311:1880-85.

Midollo osseo e sistema ematopoietico. Come nel sistema nervoso e nell'epidermide, anche nel sistema ematopoietico sono state identificate due nicchie staminali, entità distinte che forniscono segnali molecolari ed organizzazione strutturale diversa alle HSC: la nicchia osteoblastica (Figura 10B) e la nicchia vascolare (203) (204). Una caratteristica fondamentale della nicchia staminale ematopoietica è la possibilità di essere rigenerata a seguito della migrazione della cellula staminale ematopoietica, suggerendo che tale cellula sia in grado di determinare la formazione della sua stessa nicchia (205), come accade ad esempio nel fegato o nella milza di pazienti affetti da

leucemia. Nonostante gli osteoblasti e le cellule endoteliali rappresentino i principali costituenti delle nicchie staminali ematopoietiche, tutte le sorgenti delle molecole di regolazione e tutti i sistemi di modulazione, come ad esempio il sistema nervoso autonomo simpatico, devono essere considerati elementi costituenti la nicchia.

Intestino. La nicchia staminale intestinale (Figura 10C), descritta per la prima volta nella *Drosophila*, è la meno caratterizzata tra quelle finora descritte nei mammiferi. Si trova localizzata nel contesto o nelle vicinanze delle cripte di Lieberkühn e presenta un'organizzazione molto complessa, nella quale possono essere implicati diversi componenti quali miofibroblasti, cellule del sistema immunitario, cellule endoteliali, cellule del sistema nervoso enterico, cellule epiteliali differenziate, segnali endocrini, proteine della ECM, membrana basale ed infine la flora batterica residente (162).

La descrizione fornita sottolinea l'ormai evidente importanza di comprendere nel dettaglio non soltanto le caratteristiche anatomico-funzionali delle cellule staminali, ma anche la struttura anatomica delle nicchie staminali dei mammiferi ed in particolare dell'uomo, come base per la comprensione dei meccanismi biologici attivi in questa. Non devono essere infatti chiariti soltanto i meccanismi di segnalazione molecolare e gli effetti di questi sulle cellule staminali, ma anche la loro origine, cioè le cellule che li producono, e come tale sorgente risponde e reagisce in condizioni omeostatiche e di danno, al fine di ottenere un'immagine chiara e dettagliata della nicchia staminale e delle sue funzioni. L'identificazione delle differenze che caratterizzano ciascuna nicchia appare di cruciale importanza per

lo sviluppo di nuovi target terapeutici, specifici per le patologie del tessuto in esame (162).

1.3.2 LA NICCHIA STAMINALE RENALE

La capacità di rigenerare i tessuti depauperati o danneggiati è un meccanismo di difesa dell'integrità degli organismi molto importante, anche se ancora poco conosciuto. Decifrare i meccanismi molecolari alla base della rigenerazione è il presupposto fondamentale per sfruttare il suo grande potenziale biologico ed attualmente rappresenta uno degli obiettivi primari della medicina rigenerativa.

L'omeostasi di un tessuto normale prevede un bilancio tra la perdita ed il rinnovamento cellulare. Allo scopo di mantenere questo equilibrio, i tessuti possiedono cellule capaci di auto-mantenersi e di differenziare in momenti opportuni. Cellule staminali e cellule progenitrici sono le protagoniste di questi processi (206). Le cellule staminali sono definite ed identificate principalmente attraverso le loro proprietà funzionali di auto-mantenimento e clonogenicità, che garantiscono il mantenimento del *pool* staminale del tessuto, multipotenza, ovvero la capacità di generare una progenie di cellule proliferanti note come progenitori commissionati o di transito (TAC), capaci di differenziare in specifici tipi cellulari maturi con fenotipo diverso, e capacità di ripristinare l'integrità e la funzionalità di un tessuto *in vivo* (46) (115).

La visione corrente è che tra il compartimento staminale e le cellule mature di un tessuto esiste una popolazione intermedia con una più limitata capacità di rigenerazione, quella dei cosiddetti progenitori di transito che, attraverso un processo graduale di divisioni, da origine alle cellule mature. I progenitori di transito, a differenza delle cellule staminali, non sono capaci di auto-rinnovamento (207) (208).

Tale processo di evoluzione cellulare direzionale trova corrispondenza nell'organizzazione strutturale di distretti anatomici di molti tessuti adulti sede di rigenerazione. Infatti, le cellule staminali si trovano di solito localizzate in nicchie ristrette e piuttosto profonde nei tessuti, dove viene a crearsi un microambiente ideale per il mantenimento della capacità auto-rigenerante. Procedendo dalla parte più profonda della nicchia verso gli strati più distali si trova la zona di transizione, ricca di cellule progenitrici intermedie, ed ancora più superficialmente si trovano le cellule differenziate, a stadi progressivi e successivi di maturazione. In particolare, si pensa che l'organizzazione della popolazione staminale nei tessuti epiteliali, come nell'epitelio intestinale e nell'epidermide, sia piuttosto complessa e si basi su un modello ad albero genealogico (207) (208), secondo il quale tutte le linee cellulari di un tessuto prendono origine da un antenato comune capace di auto-mantenersi, la cosiddetta cellula staminale ancestrale.

Nel rene, le cellule $CD24^+CD133^+$ rappresentano una sottopopolazione di progenitori multipotenti presenti nel rene umano fin dagli stadi più precoci della nefrogenesi embrionale, specificamente localizzati al polo urinario della capsula di Bowman e dotati della capacità di contribuire alla rigenerazione di strutture sia tubulari che glomerulari, migliorando o ripristinando la funzionalità dell'organo in diversi modelli di patologia renale (20) (22) (157) (21). Le cellule $CD24^+CD133^+$ rappresentano una popolazione eterogenea, fenotipicamente e funzionalmente gerarchica di cellule staminali e progenitori, che nel contesto della capsula di Bowman si organizzano spazialmente in modo preciso e specifico: questo aspetto suggerisce, in analogia con quanto osservato in altri tessuti epiteliali e nel midollo osseo, che tali cellule rappresentino il compartimento staminale del rene, ospitato in un contesto strutturale che, per morfologia e funzione, può essere identificato come

una nicchia staminale. Questa ipotesi è sostenuta dall'osservazione che le cellule staminali embrionali, dopo il loro *commitment* verso il *lineage* differenziativo renale, migrano al polo urinario della capsula di Bowman se inoculate in reni in via di sviluppo, proprietà quest'ultima selettivamente posseduta dalle strutture che costituiscono le nicchie staminali (46) (59) (25) (209) (210) (211).

Appare pertanto ragionevole ipotizzare l'esistenza a livello renale di un "sistema renopoiетico", il cui elemento centrale è rappresentato da progenitori bipotenti localizzati al polo urinario della capsula di Bowman, dai quali può avere inizio la rigenerazione e la ricostituzione sia dei tubuli, sia delle cellule epiteliali glomerulari (117).

L'identificazione di un compartimento staminale nel rene adulto costituisce il presupposto per una migliore comprensione delle proprietà rigenerative del rene e pertanto anche per la possibilità di modificare profondamente e positivamente le opportunità terapeutiche per il trattamento dell'insufficienza renale cronica. La conoscenza dei meccanismi che determinano l'alterazione della capacità di auto-rinnovamento e multidifferenziazione delle cellule staminali in condizioni patologiche è infatti di fondamentale importanza per spiegare la ridotta capacità rigenerativa osservabile nel caso di diverse nefropatie (117) (8) (5) (150) (157) (6) (212).

Inoltre, non sono ancora conosciuti i meccanismi che regolano la crescita, la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule progenitrici renali CD24⁺CD133⁺, il cui equilibrio è essenziale per garantirne le funzioni, sia in condizioni fisiologiche che in risposta ad un danno. Come in molti altri organi adulti, la risposta delle cellule staminali renali ad un insulto è infatti verosimilmente strettamente regolata, tanto che i processi patologici che determinano la deplezione del *pool* staminale, o al contrario

una sua proliferazione incontrollata, sono attualmente interpretati come la conseguenza di una non corretta regolazione del *signaling* che normalmente interviene sulle cellule staminali, modulandone self-renewal e differenziamento, o in alternativa dell'alterazione dei programmi genetici che tali cellule attuano (213) (214) (215). Nel sistema ematopoietico la compromissione dell'equilibrio normalmente vigente tra perdita e rigenerazione cellulare può portare alla genesi dei disordini mieloproliferativi e, all'estremo opposto, dell'aplasia midollare, conseguenza, rispettivamente, di una proliferazione eccessiva ed insufficiente.

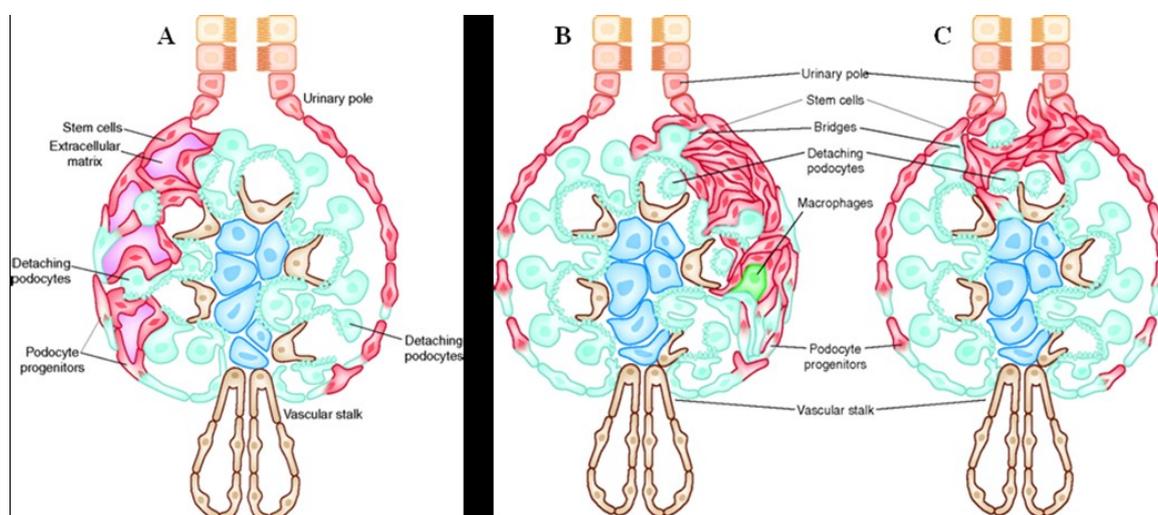


Figura 11. Illustrazione schematica del coinvolgimento dei progenitori renali in alcune glomerulopatie. (A) Limiti e difetti del potenziale rigenerativo delle cellule progenitrici renali. Età, alterazioni genetiche e fattori ambientali limitano la risposta rigenerativa dei progenitori glomerulari (in rosso), impedendo la corretta sostituzione dei podociti (in azzurro) danneggiati quando la loro perdita è eccessivamente estesa. (B) La proliferazione non regolata delle cellule staminali epiteliali del glomerulo è responsabile della formazione di lesioni iperplastiche. (C) In condizioni fisiologiche la sostituzione dei podociti segue un gradiente in cui nuovi podociti raggiungono la loro sede glomerulare passando attraverso il polo vascolare. Pertanto i podociti localizzati all'apice del glomerulo costituiscono le cellule più "vecchie" e verosimilmente più suscettibili al danno. Le cellule staminali dell'epitelio glomerulare possono proliferare e migrare dal polo urinario a quello vascolare della capsula di Bowman, verso il glomerulo al fine di sostituire i podociti danneggiati, generando in tal modo le *tip lesions*. Modificato da Lasagni et al, *J Am Soc Nephrol*. 2010.

Analogamente nel rene, ed in particolare nel glomerulo, è possibile ipotizzare che un insulto in grado di perturbare il medesimo equilibrio sia responsabile della genesi di

una proliferazione aberrante della popolazione staminale e dei progenitori, con formazione di lesioni iperplastiche ed obliterazione dello spazio di Bowman (Figura 11B), di riscontro ad esempio nella glomerulonefrite a semilune, nella così detta “*collapsing glomerulopathy*” (variante morfologica della glomerulosclerosi focale e segmentale) e nelle “*tip-lesions*” (Figura 11C) che caratterizzano istologicamente diverse glomerulopatie proteinuriche, quali la glomerulonefrite membranosa e post-infettiva e la nefropatia diabetica (9) (216) (217) (218) (219), o al contrario di una proliferazione insufficiente, non adeguata a ripristinare un normale numero di podociti in sostituzione di quelli danneggiati, con conseguente riempimento dello spazio lasciato vuoto da parte della matrice extra-cellulare, come si osserva nella FSGS (24) (220) (16) (17) e, per alcuni aspetti, nell’invecchiamento (150) (Figura 11A). È noto infatti che le cellule staminali renali esprimono un potenziale rigenerativo diverso nelle diverse fasi della vita, massimo fino all’adolescenza e progressivamente decrescente fino all’esaurimento con l’invecchiamento (150), consentendo di interpretare così i dati relativi ad una maggior incidenza ed una peggiore prognosi della malattie glomerulari nelle fasce di età più avanzate. L’accumulo di danni a livello del DNA ed una perdita della capacità di ripararli da parte dei sistemi cellulari deputati è uno dei meccanismi proposti per spiegare tale declino età-correlato delle proprietà rigenerative delle cellule staminali (221).

L’interpretazione dei meccanismi che sottendono l’equilibrio tra crescita e differenziamento dei progenitori renali durante tutte le fasi dello sviluppo e dell’accrescimento dell’organo, nel mantenimento della sua omeostasi anatomico-funzionale e in risposta ad un insulto di diversa natura costituisce dunque l’elemento critico per la comprensione profonda della biologia del sistema staminale renale: il complesso di queste informazioni e la sua corretta interpretazione rivestono infatti un

ruolo chiave per identificare i meccanismi rigenerativi latenti del rene umano, che potrebbero essere attivati e/o potenziati per indurre la regressione clinica del danno renale.

1.4

LA VIA DI SEGNALAZIONE DI NOTCH

La complessità ha sempre affascinato l'uomo. E svelarne l'essenza ha costituito un obiettivo da perseguire, oltre i confini delle singole discipline. In ambito scientifico, in particolare, ben prima dell'avvento della moderna biologia molecolare, la comprensione dei meccanismi con cui gli organismi multicellulari, i loro organi e tessuti si formano e si sviluppano, mantenendo peraltro un elevato livello di conservazione evolutiva, ha rappresentato un importante campo di ricerca. L'approfondimento delle conoscenze in questo settore ha condotto successivamente allo studio delle modalità con cui le perturbazioni dell'ambiente esterno influenzano lo sviluppo ed il funzionamento dell'organismo, in particolare quello umano, ed eventualmente conducono all'instaurarsi di processi patologici. Data la complessità strutturale e funzionale, si è resa sempre più evidente la necessità di approfondire la comprensione sul funzionamento e sulla regolazione di tali processi ad un livello cellulare e molecolare.

Lo sviluppo degli organismi multicellulari richiede infatti il coordinamento nello spazio e nel tempo di tre principali eventi, l'alterazione dei quali può rappresentare la causa dell'instaurarsi di una malattia: proliferazione cellulare, assegnazione di specifici percorsi differenziativi ad ogni gruppo di cellule e loro organizzazione nella costruzione del tessuto e quindi dell'organo. Ciascuno di questi eventi è determinato e guidato nel suo realizzarsi da una complessa rete di geni regolatori, la cui corretta espressione determina il fenotipo che ciascuna cellula acquisisce, la sua collocazione nell'ambito del tessuto ed in definitiva il suo ruolo funzionale, e dalla sua interazione con un insieme di segnali di provenienza sia intra- che extra-cellulare, l'insieme dei

quali costituisce ciò che si definisce una via di segnalazione (222). La ricerca condotta in questo ambito nelle ultime decadi ha però evidenziato come la capacità di condurre a compimento uno sviluppo ed un differenziamento così ordinati e coordinati sia in realtà legata ad un numero relativamente ristretto di percorsi molecolari e di vie di segnalazione cellulare (26). Tra questi, le *pathways* di Notch, Ras/MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinases*), Hedgehog, Wnt, TGF- β e JAK/STAT sono ampiamente conservate in tutto il regno animale e risultano coinvolte nella determinazione di diverse importanti funzioni (26).

La via di segnalazione di Notch è stata descritta per la prima volta nel 1916 in studi su mutanti genetici di *Drosophila melanogaster* che mostravano irregolari incavi (in inglese, *notches*) di tessuti mancanti a livello dell'estremità delle ali (223) (224). Il ruolo di questa *pathway* nell'ambito dei processi di sviluppo non è stato però identificato fino agli anni '30 del secolo scorso, quando fu dimostrato che la completa assenza del gene Notch comporta una iperplasia del sistema nervoso centrale embrionale, letale nell'insetto (225): durante lo sviluppo embrionale normale soltanto il 25% delle cellule dell'ectoderma ventrale acquisisce il fenotipo di neuroblasto e genera successivamente la linea neuronale, mentre il 75% differenzia in strutture epidermiche. Negli embrioni in cui l'espressione di Notch è assente si assiste ad una inappropriata selezione del fenotipo neuroblastico da parte della maggior parte delle cellule dell'ectoderma, con conseguente sviluppo di un eccesso di tessuto neuronale (da cui la denominazione di fenotipo "neurogenico" per questi mutanti) (226) (227). Gli esperimenti di clonaggio condotti negli anni '80 hanno dimostrato che il gene Notch codifica per una proteina con un singolo dominio transmembrana (228), dotata di un elevato livello di conservazione dai nematodi all'uomo, che agisce come recettore per ligandi espressi sulla superficie di cellule

adiacenti (229): in particolare, gli studi sul ruolo di Notch nell'embriogenesi neuronale della *Drosophila* hanno evidenziato come l'interazione tra il recettore ed il suo ligando sia in grado di direzionare il destino differenziativo della cellula ricevente il segnale verso il fenotipo non neuronale e che questo processo riveste un'importanza essenziale per il normale sviluppo embrionale del sistema nervoso (226) (227). Tali dati sono stati inizialmente confermati in organismi inferiori dal punto di vista evolutivo, come il verme *Caenorhabditis elegans* (230), ma successivamente, l'identificazione di omologhi del gene Notch negli invertebrati (231) e poi nell'uomo (232) ha consentito di estendere le conoscenze acquisite anche a questi organismi. Nell'uomo il gene è localizzato sul cromosoma 9 ed è ormai ampiamente dimostrato che la via di segnalazione di Notch influenza importanti processi cellulari quali il differenziamento, la sopravvivenza, l'apoptosi ed il ciclo cellulare, in contesti sia fisiologici che patologici.

1.4.1 LA VIA DI SEGNALAZIONE CANONICA ED I SUOI COMPONENTI

Quando si parla di via di segnalazione di Notch ci si riferisce ad uno specifico meccanismo molecolare altamente conservato nella scala evolutiva, ben caratterizzato nei dettagli degli elementi che lo costituiscono, denominato anche "canonico" per distinguerlo da alcune modalità di trasduzione del segnale atipiche descritte in specifici contesti (233).

La via di segnalazione di Notch è costituita da una famiglia di recettori transmembrana, dai loro ligandi, da modulatori positivi e negativi e da fattori di trascrizione. Nel mammifero sono stati descritti quattro recettori, denominati Notch1, 2, 3 e 4, e cinque ligandi strutturalmente correlati, denominati Delta-like1, 3 e 4 e

Jagged1 e 2; sia i recettori che i ligandi sono proteine integrali di membrana con un singolo dominio transmembrana (tipo I) ed architettura modulare (228) (Figura 12).

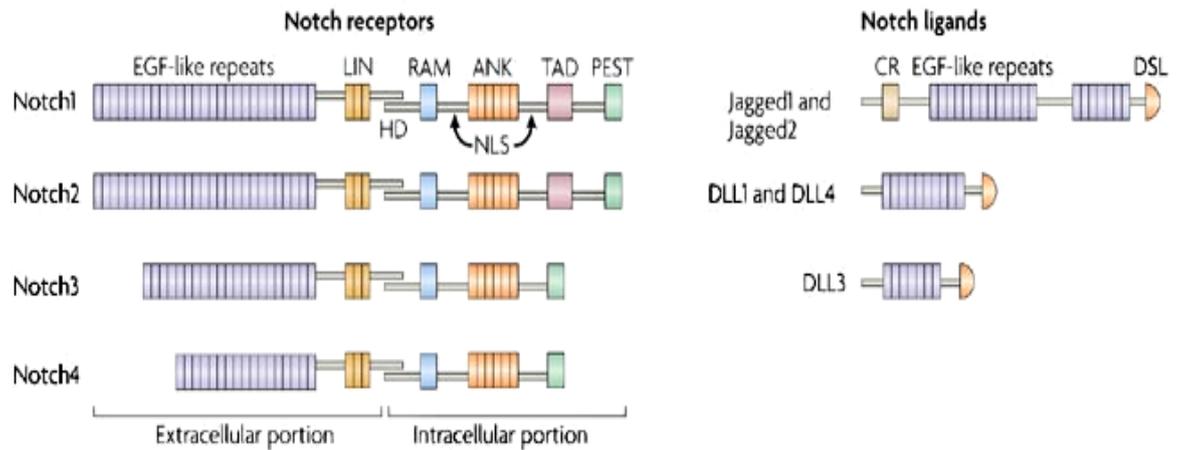


Figura 12. Struttura dei recettori e dei ligandi della via di segnalazione di Notch. Sono evidenziati gli elementi strutturali di cui ciascuna molecola è composta. Osborne BA, Nat Rev Immun, 2007; 7:64-75.

In particolare, i recettori Notch 1-4 (Figura 12) presentano un dominio extracellulare caratterizzato dalla presenza di un numero di motivi EGF-like variabile da 29 a 36, di cui quelli in posizione 11 e 12 sono essenziali per il legame al ligando, 3 moduli LNR (Lin12/Notch/Glp-1, o LIN), ricchi di residui di cisteina, prossimali alla membrana cellulare, ed una regione di collegamento ai domini transmembrana ed intracellulare; quest'ultima è importante nel prevenire la prematura attivazione del recettore e risulta alterata in più del 25% delle mutazioni attivanti identificate nella Leucemia linfoblastica acuta a cellule T (234). Il dominio intracellulare, che comprende l'estremità C-terminale, presenta quattro distinte regioni: la sequenza RAM (RBP-j_k Associated Molecule) per il legame delle proteine CSL/ RBP-j_k, 6 ripetizioni in *tandem* del dominio tipo cdc10/anchirina (ANK), necessarie per la trasduzione del segnale in quanto mediano le interazioni con alcuni co-regolatori, un

dominio di attivazione trascrizionale (*Transcriptional Activator Domain*, TAD) e la sequenza C-terminale PEST (prolina-glutammato-serina-treonina), che regola il *turnover* della proteina; sono presenti inoltre due sequenze di localizzazione nucleare (*Nuclear-localization Sequence*, NLS) ai lati delle ripetizioni ANK (235).

La maturazione e l'attivazione di Notch sono finemente controllate da una serie di tagli proteolitici operati nei pressi della porzione transmembrana: il recettore è sintetizzato come un unico precursore polipeptidico del peso molecolare di circa 300 kDa che va incontro ad un primo taglio proteolitico (*S1 cleavage*) durante il transito nell'apparato del Golgi, catalizzato da una serina-proteasi appartenente al gruppo delle furine, in corrispondenza della sequenza consenso RXR/KR, situata a breve distanza dal dominio transmembrana; vengono così generati due frammenti, uno di circa 180 kDa, contenente la maggior parte del dominio extracellulare, ed uno di circa 120 kDa, che contiene il dominio intracellulare ed una breve sequenza extracellulare, uniti tramite un legame non covalente per formare l'eterodimero che si colloca sulla superficie cellulare (26) (235).

L'attivazione della cascata di trasduzione del segnale richiede il contatto cellula-cellula (235) e l'interazione tra la regione N-terminale del ligando ed i domini EGF-like 11 e 12 del recettore (236), cui seguono, come ampiamente dimostrato, altri due eventi proteolitici (Figura 13), critici per il l'avvio del processo: il riconoscimento del ligando induce nel recettore una modificazione conformazionale cui consegue l'esposizione di un sito di clivaggio situato nel dominio extracellulare, altrimenti inaccessibile all'enzima responsabile del secondo taglio proteolitico (*S2 cleavage*), denominato TACE (*TNF- α Converting Enzyme*, noto anche come ADAM17), membro della famiglia delle metalloproteasi ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*).

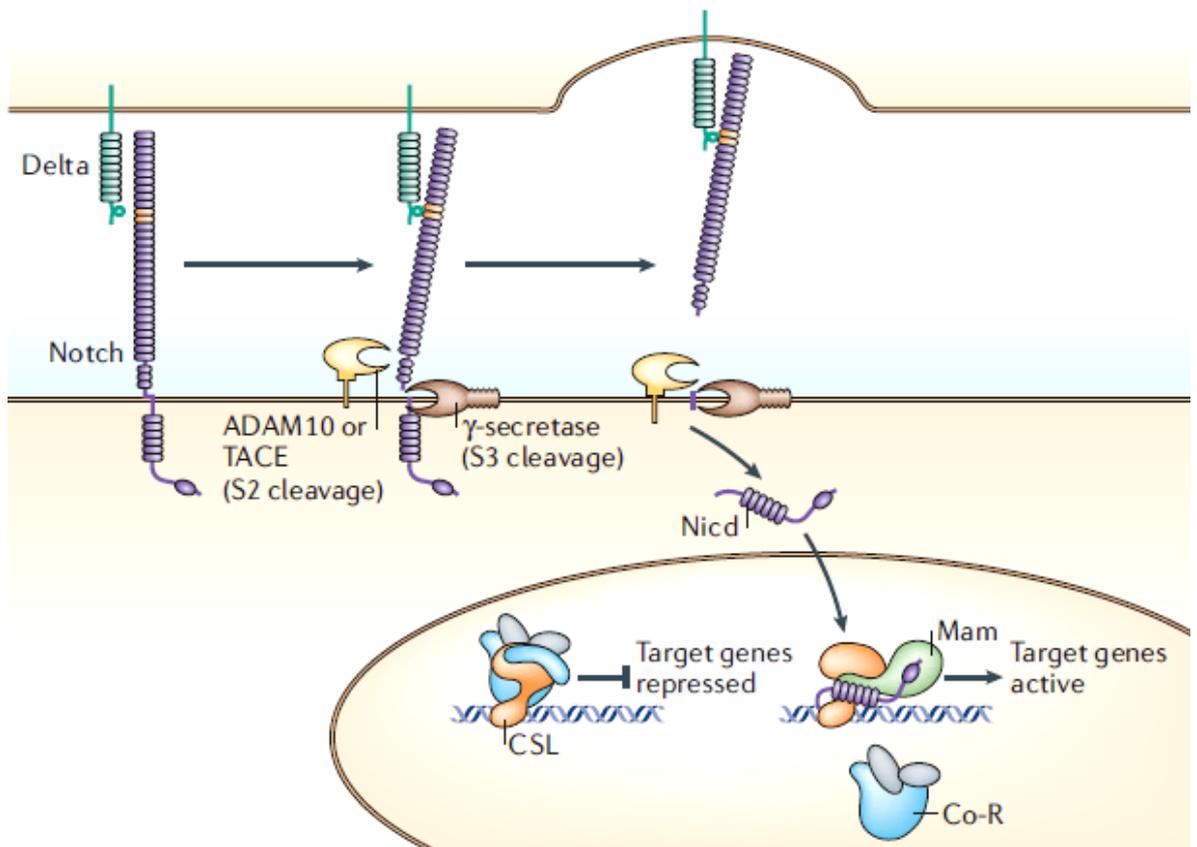


Figura 13. La via di segnalazione canonica di Notch: dall'interazione con il ligando alla modificazione del profilo trascrizionale della cellula. *Bray SJ, Nat Rev Mol Cell Biol, 2006; 7(9):678-89.*

L'attività enzimatica risulta nella rimozione della porzione extracellulare del recettore con conseguente creazione di un frammento denominato NEXT (Notch *Extracellular Truncation*), che resta ancorato alla membrana cellulare e che rappresenta il substrato del complesso delle γ -secretasi (26) (235). Tale complesso enzimatico è costituito dalle molecole Presenilina (PSEN) 1 e 2, nicastrina, APH1 (*Anterior Pharynx-Defective 1*) e PEN2 (*Presenilin Enhancer 2*) (237) ed è attivo in numerosi compartimenti di membrana, risultando responsabile della proteolisi di diverse proteine integrali di tipo I (238). Il clivaggio di Notch (*S3 cleavage*), operato a livello del dominio intracellulare, risulta nel rilascio del frammento solubile NICD

(*Notch Intracellular Domain*), tappa finale di una sequenza altamente coordinata che prevede la produzione della molecola attiva soltanto in conseguenza della corretta sintesi, esposizione sulla superficie cellulare ed attivazione del recettore da parte del ligando. Il frammento NICD trasloca quindi nel nucleo, dove si lega alle proteine leganti il DNA della famiglia RBP-J_k (*Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*, note anche come CSL, acronimo di CBF1/Su(H)/Lag2, che corrispondono ai nomi di tali molecole rispettivamente nel mammifero, nella *Drosophila* e nel *Caenorhabditis elegans*) (26) (237), un complesso di fattori di trascrizione altamente conservato, che in assenza dell'attivazione del recettore Notch agisce come un repressore genico in associazione con altre molecole (234). L'interazione di NICD con le proteine RBP-J_k comporta l'allontanamento di repressori, in particolare l'enzima istone deacetilasi (*Histone Deacetylase*, HDAC) (239), e il reclutamento di attivatori, tra cui ad esempio Mastermind (Mam, nell'uomo hMAML) e SKIP (*Ski-interacting Protein*) (234) (241) (242), trasformando così il complesso proteico da repressore ad attivatore trascrizionale. Tra i principali target del complesso NICD-RBP-J_k si annoverano la famiglia dei fattori di trascrizione bHLH (*basic helix-loop-helix*) HES (*Hairy/enhancer of Split*) (243) ed i loro omologhi Hey (*Hairy/enhancer-of-split Related with YRPW motif*) (244), che costituiscono gli effettori della via di segnalazione di Notch; queste proteine sono dei repressori trascrizionali che agiscono mantenendo down-regolati geni tessuto-specifici. È verosimile tuttavia che la lista dei target di Notch sia destinata allungarsi (244).

1.4.2 REGOLAZIONE DELLA VIA DI SEGNALAZIONE

È ormai noto che la risposta cellulare all'attivazione della cascata di trasduzione del segnale di Notch varia molto in relazione alla cellula in cui si verifica ed in particolare del contesto in cui avviene. La capacità di elicitare differenti risposte cellulari potrebbe dipendere infatti almeno in parte dall'interazione con altre vie di segnalazione, oppure dalla presenza di diversi modulatori che risultano responsivi al segnale in un determinato tipo cellulare (234).

Un importante sistema di regolazione operante a livello trascrizionale è rappresentato dalla così detta "inibizione laterale", la cui descrizione ha costituito una pietra miliare nell'interpretazione di molti processi cellulari in cui è coinvolto Notch. Tale meccanismo è infatti in grado di spiegare come due cellule inizialmente identiche intraprendano, ad un certo punto del loro sviluppo, due diversi percorsi differenziativi. Si tratta di un tipo di interazione cellula-cellula in cui una cellula che adotta un fenotipo particolare inibisce quelle adiacenti nel fare altrettanto attraverso il *signaling* di Notch accoppiato a sistemi di amplificazione trascrizionale. Inizialmente due cellule interagenti sono equivalenti dal punto di vista delle potenzialità di differenziamento, esprimendo livelli comparabili dei vari componenti della *pathway* di Notch e perciò possedendo una eguale capacità di comportarsi come cellula che invia o che riceve questo tipo di segnale. Nel tempo si verifica però una differenza stocastica nel pattern di espressione delle due cellule, tale per cui una incrementa la produzione di molecole recettoriali e l'altra di ligandi e queste differenze vengono amplificate attraverso circuiti di *feed-back* sia intra- che inter-cellulari. Il segnale così trasdotto comporta l'acquisizione di un diverso fenotipo nelle due cellule: quella che esprime i più alti livelli di ligando si comporta come

cellula che invia il segnale, mentre quella che incrementa l'espressione dei recettori da cellula ricevente, rendendo il *signaling* unidirezionale. Questo comporta l'inibizione, nella cellula ricevente il segnale, dell'acquisizione dello stesso fenotipo della cellula da cui è inviato (26).

Un ulteriore livello di regolazione sembra essere rappresentato dai meccanismi che garantiscono la stabilizzazione o, al contrario, la degradazione e l'inibizione degli mRNA (ad esempio ad opera dei microRNA, miRNA) dei geni target di Notch (234). È stato inoltre dimostrato che l'attività del *signaling* di Notch è estremamente sensibile alle modificazioni conformazionali della cromatina, al suo livello di acetilazione e all'arrangiamento strutturale degli istoni (regolazione epigenetica), che potrebbero essere coinvolti nel determinare la specificità del profilo di espressione mediato da Notch (234). Le conoscenze relative a queste modalità di regolazione della cascata di trasduzione di Notch sono ancora scarse e sono numerosi gli studi in corso mirati alla loro acquisizione.

L'apparente semplicità della cascata di eventi che costituisce la via di segnalazione canonica di Notch è contrastata dall'esorbitante complesso di meccanismi di regolazione attivi a livello non soltanto trascrizionale ma anche, e soprattutto, post-traduzionale e cellulare descritti negli ultimi anni e rivelatisi fondamentali nella regolazione di molteplici aspetti del funzionamento della *pathway*. L'attuale comprensione del ruolo di ciascuno di questi è scarsa, ma la loro importanza è dimostrata dalla mancata corrispondenza tra differenze drammatiche evidenziate a livello funzionale, sia nelle cellule che inviano che in quelle che ricevono il segnale mediato da Notch, ed i livelli di espressione dei recettori o dei ligandi, che risultano spesso non significativamente diversi (234). Nonostante quindi l'espressione dei costituenti la via di segnalazione di Notch risulti estremamente dinamica e si

modificati durante le diverse fasi dello sviluppo dell'organismo, è verosimile che un rilevante sistema di regolazione sia quello che agisce successivamente ai processi di traduzione (Figura 14).

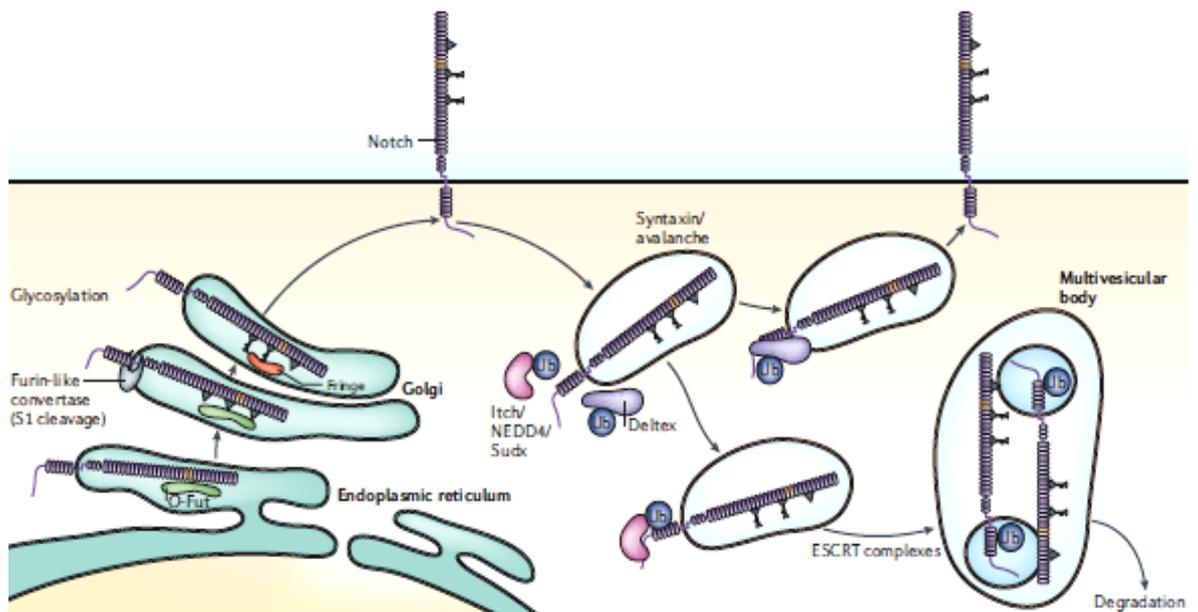


Figura 14. Processazione e traffico del recettore modificano l'attività del *signaling* di Notch. Notch (in viola) è prodotto nel reticolo endoplasmatico, dove interagisce con l'enzima O-fucosil transferasi (O-Fut; in verde) ed è trasportato nell'apparato di Golgi; in questa sede è ulteriormente processato dalla convertasi furina-like (S1 cleavage; in grigio) e glicosilato ad opera di O-Fut e di altre glicosil-transferasi (ad esempio Fringe; in rosso) prima di essere trasportato sulla superficie cellulare. L'endocitosi del recettore può portare al suo riciclo o alla degradazione attraverso la via dei corpi multi-vesicolari. Il processo di ubiquitinazione regola il traffico e la distribuzione del recettore nei diversi compartimenti cellulari. Modificato da *Bray SJ, Nat Rev Mol Cell Biol, 2006; 7(9):678-89.*

Tra i principali meccanismi appartenenti a questa categoria si possono ricordare:

1. Glicosilazione del recettore: le ripetizioni EGF-like presenti nel dominio extracellulare di Notch costituiscono siti di glicosilazione. L'enzima O-fucosil-transferasi (O-Fut/Pofut-1) catalizza il trasferimento di una molecola di fucosio necessaria per la formazione di un recettore funzionalmente attivo (246) (246), come dimostrato dal fatto che la deplezione di questa attività

enzimatica genera un fenotipo sovrapponibile a quello determinato dall'assenza della segnalazione attraverso questa via (ad esempio per mutazione dei costituenti del complesso delle γ -secretasi) (234). È stato inoltre dimostrato che l'enzima O-Fut possiede attività di *chaperone* ed è pertanto implicato nella determinazione del corretto *folding* del recettore e nel suo trasporto dal reticolo endoplasmatico alla membrana cellulare (248). Un altro enzima con importante ruolo di regolazione è Fringe, una glicosiltransferasi che agisce catalizzando il trasferimento di residui di glucosio sui domini EGF-like, successivamente all'attività di O-Fut. Questo processo è in grado di generare un elevato numero di recettori con variabile livello di glicosilazione e, potenzialmente, diverso grado di affinità per il ligando (26) (249).

2. Proteolisi del recettore e del ligando: oltre ai ben noti meccanismi precedentemente descritti (*S1, S2 e S3 cleavage*), che costituiscono gli eventi molecolari essenziali per l'attivazione della cascata di trasduzione del segnale, sono stati recentemente delineati alcuni altri esempi di proteolisi con potenziale ruolo di regolazione. Tra questi si annovera, ad esempio, la proteolisi dei ligandi di Notch operata nel loro dominio intracellulare, che sembra contribuire alla *down-regulation* del ligando stesso ed alla generazione di un frammento solubile, che trasloca nel nucleo ed attiva una segnalazione indipendente (250) (251). Infine, è stato descritto un ulteriore evento proteolitico potenzialmente rilevante a carico della porzione C-terminale del dominio intracellulare del recettore Notch, da cui risulta la produzione di un frammento NICD particolarmente stabile data la rimozione

della sequenza PEST, normalmente responsabile del suo rapido *turnover* (252).

3. Endocitosi e ubiquitinazione del recettore e del ligando: a partire dai primi studi di genetica condotti sulla *Drosophila*, un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali sostiene l'importanza dell'endocitosi nella produzione di un segnale funzionalmente efficace (253) (254). Uno dei possibili ruoli attribuibili a questo processo è quello di generare delle forze dinamiche durante l'invaginazione della membrana, che potrebbero favorire le modificazioni conformazionali del recettore necessarie per l'esposizione del sito di clivaggio su cui agiscono gli enzimi proteolitici della famiglia ADAM (254) (255) (255). Questo meccanismo presiede probabilmente al controllo della corretta attivazione di Notch, ossia impedisce che questa avvenga in assenza dello stimolo opportuno, rappresentato dal legame del ligando. Come dimostrato anche per altre vie di segnalazione, l'endocitosi di Notch è necessaria sia per l'attivazione della trasduzione del segnale che per la sua degradazione e *down-regulation*: il recettore può infatti essere distribuito in parte al compartimento endosomiale di riciclaggio, che provvede alla riesposizione della molecola sulla superficie cellulare, ripristinando le potenzialità della cellula di rispondere ad opportune stimolazioni, in parte ai sistemi di degradazione intracellulare (compartimento endosomiale tardivo, che comprende i corpi multi-vescicolari ed i lisosomi di degradazione), ed in parte ai così detti endosomi di segnalazione, nei quali un microambiente favorevole e particolari caratteristiche, quali la corretta rappresentazione dei lipidi di membrana, l'ubiquitinazione operata da specifici enzimi (E3 ubiquitina-ligasi), l'opportuna acidificazione dell'endosoma ed il trasporto

fuori da questo mediato da opportuni trasportatori, favoriscono la produzione di un segnale efficace (26).

Sorprendentemente, l'endocitosi è stata dimostrata anche a livello della cellula che invia il segnale, cioè a carico del ligando, anche se non è ancora chiaro quale sia il meccanismo con cui ciò influisce sull'attivazione del *signaling* di Notch (257). Questo processo, che richiede l'intervento di specifiche molecole, tra cui le E3 ubiquitina-ligasi Neuralized e Mindbomb (257), potrebbe incrementare l'attività del ligando potenziando la forza necessaria ad indurre nel recettore le modificazioni strutturali richieste per l'esposizione dei siti di proteolisi. Inoltre, non si può escludere che l'endocitosi dei ligandi provveda alla creazione di un *pool* di molecole prontamente disponibili ad essere rilasciate nelle circostanze in cui sia richiesta l'attivazione del segnale (26).

4. Segregazione asimmetrica dei regolatori intracellulari: durante lo sviluppo dei metazoi, i diversi destini differenziativi a cui ciascuna cellula va incontro possono essere determinati, oltre che dall'attuazione di determinati programmi genetici e da specifiche interazioni cellula-cellula, dalla distribuzione asimmetrica di molecole regolatrici nelle cellule in mitosi. Studi recenti hanno dimostrato come questo meccanismo rivesta un ruolo rilevante nella regolazione del *signaling* di Notch. L'esempio sicuramente meglio caratterizzato è quello di Numb, una proteina associata alla membrana che riconosce e lega Notch, inibendone l'attività: durante la divisione cellulare Numb si concentra specificamente in una regione di morfologia crescentica localizzata ad un polo della cellula madre e successivamente segrega asimmetricamente in una sola delle cellule figlie che si generano; in questa

sede Numb può quindi inibire la cascata di segnalazione di Notch accelerandone la degradazione (258) e/o sequestrando in vescicole di endocitosi o inattivando il modulatore positivo di Notch Sanpodo (259). Il meccanismo della segregazione asimmetrica interessa anche altre molecole, tra cui Neuralized, una E3 ubiquitina-ligasi responsabile dell'endocitosi dei ligandi (261), e alcune molecole, come Rab11 e Sec15, coinvolte nella localizzazione sub-cellulare degli stessi (261) (262). Recentemente infine, in aggiunta ai dati descritti, è stata fornita la dimostrazione che un analogo processo di segregazione asimmetrica può riguardare non solo singole molecole ma anche interi endosomi contenenti Notch, Delta e la proteina Sara: la presenza al loro interno dell'attività γ -secretasica consente la produzione del frammento recettoriale attivo NICD, conferendo alla cellula a cui selettivamente tale complesso è trasmesso, un aumentato livello di segnalazione (263).

La linearità che classicamente si vorrebbe attribuire, per necessità di semplificazione, ad una via di segnalazione intracellulare, nel caso di Notch è quindi ampiamente contraddetta dal voluminoso complesso di evidenze sperimentali a sostegno dell'esistenza di un alto livello di regolazione operante sulle diverse fasi del processo di trasduzione del segnale (trascrizione, traduzione, epigenetica) e dell'influenza del *milieu* biologico in cui la stessa via di segnalazione opera. La comprensione del meccanismo d'azione di questi processi, della loro integrazione a livello molecolare e delle modalità con cui generano la regolazione spazio-temporale del *signaling* di Notch costituisce un importante obiettivo della ricerca nel prossimo futuro.

1.4.3 IL RUOLO DI NOTCH NEI SISTEMI STAMINALI: IDENTIFICAZIONE DELLA “STEM CELL PATHWAY”?

Le cellule staminali sono cellule rare e dotate di caratteristiche uniche, responsabili in larga parte della costruzione e ricostruzione dei tessuti e degli organi durante l'embriogenesi, la crescita post-natale e la riparazione del danno. L'equilibrio tra self-renewal e differenziamento deve essere finemente controllato durante tutti questi processi, poiché una alterazione della rappresentazione di tali cellule, per impropria attivazione o mancato mantenimento, può condurre alla deplezione del *pool* staminale e alla depauperazione del tessuto, mentre al contrario un self-renewal incontrollato è caratteristico dei processi tumorali (202) (244).

La via di segnalazione di Notch presenta un elevato livello di conservazione evolutiva ed è coinvolta nel controllo di un ampio spettro di eventi che interessano i sistemi staminali, sia durante l'embriogenesi che nello sviluppo post-natale e nell'omeostasi tissutale degli organismi multicellulari, e la sua disregolazione è responsabile di diversi processi patologici, caratterizzati spesso da difetti di sviluppo (265).

IL SIGNALING DI NOTCH NELLE CELLULE STAMINALI DURANTE LO SVILUPPO EMBRIONALE E L'ORGANOGENESI

Le prime informazioni in merito sono state ottenute, come precedentemente descritto, da studi sulla neurogenesi embrionale della *Drosophila* (225) e sono state confermate in seguito anche nel verme *Caenorhabditis elegans* (230).

È stato così evidenziato il ruolo della via di segnalazione nella determinazione del destino differenziativo di cellule staminali immature ed in particolare nella scelta tra due possibili opzioni, inizialmente equivalenti (*binary cell fate choice* degli autori anglosassoni). Gli studi dettagliati su questo tipo di meccanismo regolativo, definito anche “segnalazione o inibizione laterale” (Figura 15B) per le modalità con cui si instaura tra cellule adiacenti, hanno suggerito che Notch possa essere implicato nell’inibizione dell’assunzione di un fenotipo *default* (detto anche “destino primario”, ossia il fenotipo che la cellula acquisisce se non riceve stimoli contrari) nelle cellule staminali in cui si attiva, favorendo in tal modo l’acquisizione di un percorso differenziativo alternativo (“secondario”) rispetto a quello che la cellula avvierebbe (226) (266) (266) (268) (269). Le cellule in cui il *signaling* di Notch è attivato, *committed* verso il fenotipo secondario, possono intraprendere questo percorso immediatamente dopo l’attivazione della cascata di segnalazione o in un secondo momento, mantenendo in tal caso uno stato indifferenziato fino al momento del differenziamento (266).

Successivamente è stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento di Notch nella regolazione di diversi altri tipi di processi differenziativi, in particolare delle interazioni che intercorrono tra cellule che si presentano inizialmente distinte l’una dall’altra dal punto di vista delle potenzialità di acquisizione di un determinato fenotipo: un crescente numero di osservazioni suggerisce infatti che il *signaling* di Notch, oltre ad inibire un determinato tipo di differenziamento nella cellula staminale o nel progenitore in cui si attiva, possa anche promuovere in modo diretto in alcuni tipi cellulari la specificazione differenziativa (così detta *inductive cell fate interaction*). In questo caso Notch agisce come fonte di un “segnale di induzione” (Figura 15C) tra cellule non equivalenti e chiaramente distinte, la cellula che invia il

segnale (che esprime il ligando) e la vicina cellula che lo riceve (che esprime il recettore). Si possono annoverare come esempi di questo paradigmatico meccanismo di azione la determinazione precoce dei blastomeri in *Caenorhabditis elegans*, la modellazione dei coni a partire dai precursori dei fotorecettori nella retina (*up-regulation* mediata da Notch di *master control genes* quali *vestigial (vg)*, *eyeless (ey)* e *Distal-less (Dll)* nei dischi immaginali) (270) e la formazione dei margini che separano la superficie ventrale e dorsale delle ali della *Drosophila* (26) (234) e, nei mammiferi, la formazione delle cellule dell'estremità di vasi neoformati durante l'angiogenesi e il differenziamento neuronale, ed in particolare, l'induzione del fenotipo gliale: in questo specifico contesto l'attivazione di Notch media l'acquisizione del fenotipo gliale piuttosto che semplicemente l'inibizione del differenziamento a neuroni, come precedentemente descritto (26). Nei vertebrati, inoltre, il coinvolgimento di questo meccanismo di azione di Notch è stato dimostrato ad esempio nella formazione delle cellule ciliate dell'orecchio interno (271), nella produzione delle cellule β -pancreatiche secernenti insulina (272), nel differenziamento delle cellule calciformi mucipare e delle cripte intestinali (273) ed in numerose fasi del differenziamento dei linfociti T e B (274) (275).

Una considerazione di carattere generale che si può dedurre da quanto descritto è pertanto che nei processi di sviluppo Notch determina la creazione di un legame tra il destino di una cellula e quello della cellula adiacente, al punto tale da poter sostenere che, se due cellule vicine seguono un diverso percorso differenziativo, è molto probabile che Notch sia coinvolto.

Da quanto descritto emerge come l'inibizione del differenziamento, la specificazione del *lineage* in momenti critici dello sviluppo e lo stimolo all'acquisizione di un

particolare percorso differenziativo siano funzioni rilevanti assolute da Notch durante lo sviluppo embrionale (Figura 15).

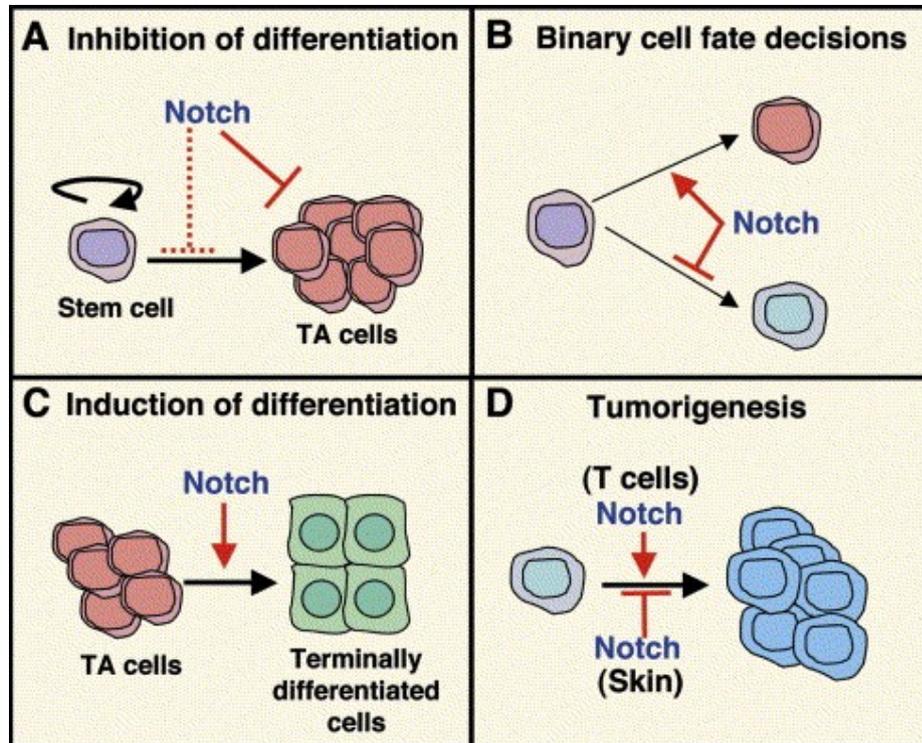


Figura 15. Effetti pleiotropici del signaling di Notch. (A) Funzione gate-keeper: Notch mantiene le cellule staminali e/o le TAC in uno stato indifferenziato (B) Binary cell fate decision (C) Induzione del differenziamento. (D) Tumorigenesi. Radtke F et al, FEBS Lett,2006;580(12):2860-8

Come può quindi la *pathway* di Notch, caratterizzata da un così elevato livello di conservazione, non solo evolutiva ma anche del proprio meccanismo di funzionamento, regolare così tanti e talvolta contrastanti obiettivi? Una spiegazione ovvia, e perciò superficiale, è che la funzione di Notch sia dipendente dal contesto in cui si trova ad agire, tanto che è stato dimostrato in diverse specie, compreso l'uomo, che mentre in un tessuto Notch può avere un ruolo permissivo nei confronti di un evento cellulare, in un altro può determinarne l'inibizione (244). Poiché anche la comprensione di ciò che significa "contesto" non è semplice da ottenere, risulta di

fondamentale importanza approfondire le conoscenze sulle vie di segnalazione che interagiscono o influenzano quella di Notch in un determinato tessuto o popolazione cellulare, in quanto questo potrebbe rappresentare un importante meccanismo di diversificazione degli *outcomes* rilevati in diverse circostanze. In alternativa, diversi recettori Notch potrebbero indurre diversi programmi di espressione genica, oppure la funzione di Notch potrebbe essere controllata a livello dei ligandi (276).

Il corretto sviluppo tissutale richiede inoltre che il differenziamento cellulare sia coordinato ad un livello più complesso con il globale controllo delle dimensioni e dell'identità del tessuto, e la via di segnalazione di Notch è largamente coinvolta nella regolazione dei processi che garantiscono nelle cellule staminali tale integrazione morfologica e funzionale, tra cui ad esempio la proliferazione cellulare, il self-renewal, l'apoptosi, la formazione dei margini, la transizione epitelio-mesenchima negli organismi evolutivamente superiori. Informazioni importanti a tale proposito sono state ottenute con studi di mutagenesi condotta selettivamente su geni codificanti per costituenti della *pathway* di Notch (Notch1-4, Dll1-3-4, Jag1-2) nel topo: letalità precoce (fasi precoce ed intermedia dello sviluppo embrionale), somitogenesi anomala, aberrante strutturazione del sistema vascolare, apoptosi incontrollata, eccessivo differenziamento neuronale sono solo alcune delle alterazioni rilevate in questi esperimenti, da cui pertanto è emerso come la via di segnalazione di Notch abbia un ruolo fondamentale per la corretta realizzazione di importanti processi embrio- ed organo-genetici. Poiché però, il fenotipo risultante dall'inattivazione di geni diversi non risulta spesso sovrapponibile e quindi determinato in modo inequivocabile, è plausibile affermare che esistono ulteriori livelli di modulazione della loro espressione e del funzionamento stesso del *signaling* (276).

I risultati degli studi condotti nel topo hanno affiancato le conoscenze derivanti dall'identificazione del coinvolgimento di Notch in alcune patologie genetiche umane, caratterizzate da anomalie dello sviluppo e dell'organogenesi, tra cui la Sindrome di Alagille, la Disostosi spondilo-costale e la sindrome CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*).

La sindrome di Alagille (o displasia arterio-epatica) è una malattia autosomica dominante, a penetranza ed espressività variabile, spesso sporadica ma per la quale sono stati descritti anche casi di trasmissione familiare; è caratterizzata da anomalie a livello del fegato, del cuore, dello scheletro, dei reni, dell'occhio, del pancreas e da una *facies* caratteristica. Talvolta può essere presente un ritardo mentale da leggero a moderato (277). Gli studi di clonaggio hanno rilevato come questa malattia sia causata da mutazioni a carico del gene codificante per Jagged1 (279) (280). L'ampia varietà di anomalie morfo-funzionali che si riscontrano in questa patologia supporta ulteriormente l'importanza del *signaling* di Notch per la corretta organogenesi di diversi apparati.

La Disostosi spondilo-costale è una rara malattia genetica caratterizzata da malformazioni multiple vertebrali e costali, che causano bassa statura, deformità del collo e della gabbia toracica e malattia respiratoria di tipo restrittivo, che rappresenta normalmente la causa di morte. È causata da mutazioni trasmesse con modalità autosomica recessiva del gene codificante per Delta-like3 (277). La sua descrizione ha condotto all'identificazione del ruolo del *signaling* di Notch nella regolazione della formazione dei somiti e nella loro suddivisione nelle porzioni anteriore e posteriore, dalla cui alterazione derivano appunto le anomalie scheletriche che caratterizzano la malattia (281).

Infine, la sindrome CADASIL è caratterizzata da una trasmissione autosomica dominante e da anomalie vascolari che comportano lo sviluppo di un'ampia varietà di sintomi, tra cui emicrania con aura, disturbi dell'umore, infarti ischemici subcorticali ricorrenti, declino cognitivo progressivo fino alla demenza e morte precoce (277). Le lesioni vascolari riscontrate nella sindrome sono di tipo non aterosclerotico e non amiloide ed interessano principalmente i vasi di piccolo calibro cerebrali, nonostante possano essere riscontrate in diverse sedi anche a livello sistemico (277). La sindrome CADASIL è causata da mutazioni nel gene codificante per il recettore Notch3 (282), che quindi riveste un ruolo cruciale nella corretta formazione delle strutture vascolari.

Il ruolo di Notch nella regolazione delle funzioni delle cellule staminali nell'ambito dei processi di sviluppo embrionale e di organogenesi può essere schematicamente riassunto come segue (276):

1. Promozione del differenziamento delle cellule staminali primordiali in cellule staminali tessuto-specifiche nelle fasi precoce ed intermedia dello sviluppo embrionale.
2. Inibizione del differenziamento delle cellule staminali organo- e tessuto-specifiche ed espansione del *pool* staminale residente con mantenimento in uno stato indifferenziato.
3. Stimolazione di un percorso differenziativo alternativo rispetto a quello *default* nelle fasi tardive del differenziamento.

Sembra quindi possibile affermare che negli organismi complessi Notch agisce in fasi diverse dello sviluppo, talvolta anche nel contesto di un singolo tessuto, e che pressoché tutti gli elementi cellulari richiedano, ad un certo punto del loro

differenziamento ed inserimento nel contesto dell'organo che vanno a costituire, il contributo di Notch (26).

IL SIGNALING NEI SISTEMI STAMINALI ADULTI

Le cellule staminali sono attualmente considerate le principali responsabili del mantenimento dell'omeostasi dei tessuti e degli organi durante il corso della vita post-natale. Conservano infatti intatto il *pool* staminale (controllando il numero e le proprietà funzionali delle cellule staminali residenti) così come garantiscono una corretta rappresentazione delle cellule terminalmente differenziate, sia durante il normale *turnover* tissutale sia in seguito all'inferimento di un insulto che richiede un processo di riparazione.

Il *signaling* di Notch è coinvolto nella regolazione di molteplici processi finalizzati a tali obiettivi in numerosi sistemi staminali, tra i quali si possono ricordare:

- Cute e follicolo pilifero: Notch1, 2 e 3 sono espressi in diversi strati cellulari costituenti il follicolo pilifero; è stato dimostrato che, successivamente allo sviluppo embrionale, in cui il ruolo di Notch non sembra essere rilevante (283), sia l'inibizione che l'iperattivazione della via di segnalazione causano una perdita di elementi piliferi con formazione di cisti e conseguente alopecia irreversibile per induzione del passaggio dalla fase di *anagen* a quella di *catagen* (alterazione del ciclo vitale) (283) (283) (284) (285). Studi di genetica condotti nel topo hanno evidenziato inoltre che un'eccessiva attivazione del *signaling* di Notch è responsabile della genesi di iperplasia epidermica, consentendo di concludere che, in condizioni fisiologiche, Notch inibisce il differenziamento delle cellule staminali del

follicolo a cellule epidermiche, favorendo invece il differenziamento a cheratinociti specifici delle strutture pilifere (287). Infine, è stato ipotizzato il coinvolgimento di Notch nell'oncogenesi cutanea (288).

- Sistema ematopoietico ed immunitario: il sistema ematopoietico è certamente il sistema staminale meglio caratterizzato. Tuttavia, nonostante le HSC siano state identificate ormai più di 25 anni fa, i meccanismi molecolari e lo specifico microambiente che regolano il loro self-renewal e differenziamento sono lontani dall'essere ben compresi.

L'importanza rivestita dal *signaling* di Notch nei processi ematopoietici è stata inizialmente suggerita dall'identificazione della sua associazione con alcune neoplasie ematologiche: questo ha successivamente generato un grande interesse nella chiarificazione del ruolo di Notch nella regolazione di processi come l'assegnazione del *lineage* differenziativo e il differenziamento delle HSC durante l'ematopoiesi (237).

L'elevato livello di espressione dei costituenti della via di segnalazione di Notch nell'ambito del sistema ematopoietico adulto (dalle HSC ai progenitori, fino alle cellule mature) (289) ha infatti suggerito che questa *pathway* possa rivestire un ruolo importante nell'ematopoiesi, attualmente ampiamente dimostrato dallo studio di quella embrionale: infatti, nonostante Notch1 non sia indispensabile per l'ematopoiesi primitiva che si realizza nel sacco vitellino (la cui funzione principale è la rapida produzione di cellule della linea rossa, che trasportano ossigeno ai tessuti embrionali in continuo accrescimento), è tuttavia essenziale per la produzione del *pool* di HSC, capace di generare poi tutte le cellule ematiche e di ripopolare il midollo osseo (*Bone Marrow*, BM) nel processo

chiamato ematopoiesi definitiva, che nell'embrione si realizza nella regione AGM (aorta-gonadi-mesonefro). Al contrario Notch2 non sembra essenziale né per l'ematopoiesi primitiva né per quella definitiva (290).

Resta invece controversa l'importanza di Notch nella regolazione del self-renewal e del mantenimento delle HSC nella vita post-natale. I dati sinora ottenuti mostrano che l'over-espressione sperimentalmente indotta di Notch1 incrementa il self-renewal (291) ed inibisce il differenziamento dei progenitori e delle HSC, mantenendoli nello stato indifferenziato, sia *in vivo* (292) che *in vitro* (293); in tal modo Notch, la cui azione si esplica soprattutto a livello delle cellule più immature, mantiene, e può espandere, il compartimento staminale midollare (237). Nonostante ciò, non esiste alcun modello genetico a supporto di questa ipotesi (237) (276) (294) e sono state fornite anche prove contrarie a quanto affermato (295) (296). Pertanto, resta da chiarire quale sia il reale ruolo di Notch soprattutto nella regolazione di questi processi in condizioni basali. Molto probabilmente, questo apparente contrasto deriva dal fatto che l'azione di Notch è fortemente influenzata dal livello di maturazione della cellula su cui agisce (237). In alternativa, è possibile che tali differenze derivino da diversità delle condizioni sperimentali (202).

I componenti della *pathway* di Notch sono variamente espressi a livello dei diversi tipi cellulari che costituiscono la nicchia staminale ematopoietica osteoblastica (sia nelle HSC che nelle cellule non staminali) e probabilmente partecipano al *cross-talk* che si instaura tra cellula staminale ematopoietica e microambiente circostante, indispensabile per mantenerne l'omeostasi. Tuttavia, ancora una volta, non esiste un'interpretazione

univoca dei dati finora ottenuti e la genetica non fornisce risultati a sostegno di questa ipotesi (237) (294); ciò che certamente si può affermare, comunque, è che Notch coopera con altre vie di segnalazione nella regolazione dell'ematopoiesi (294).

Al contrario sembra ormai chiaro il ruolo essenziale che Notch svolge nel determinare il *commitment* dei linfociti T nel compartimento linfoide adulto (289). L'inattivazione di Notch nei progenitori midollari determina infatti un blocco nella produzione di linfociti T e lo sviluppo ectopico di linfociti B nel timo, suggerendo che Notch induca nel progenitore linfoide precoce l'adozione del fenotipo T, mentre in assenza di questo stimolo il differenziamento procede verso l'acquisizione del fenotipo B, che quindi si configura come il fenotipo *default* dei progenitori linfoidi. Al contrario, un'aumentata espressione di Notch determina un differenziamento ectopico di linfociti T nel BM, a spese del compartimento B (297). Notch è dunque essenziale per il *commitment* verso il lineage T. Inoltre il *signaling* di Notch promuove il differenziamento delle cellule pro-T a pre-T a livello del timo, controllando il riarrangiamento del TCR (*T-cell Receptor*) attraverso la regolazione dell'accessibilità della cromatina (297), assicurando così la corretta formazione di un complesso pre-T, essenziale per lo sviluppo dei timociti.

Un ruolo aggiuntivo è stato descritto nel differenziamento dei linfociti splenici. Linfociti B immaturi di derivazione midollare entrano nella milza e differenziano sia in cellule B follicolari che in cellule della zona marginale: il *signaling* di Notch sembra importante per il differenziamento di queste ultime (297).

In definitiva, quindi, l'unico ruolo chiaro attribuibile a Notch nell'ematopoiesi è quello di influenzare le decisioni sul *lineage* differenziativo da adottare nei progenitori in momenti chiave dello sviluppo e, conseguentemente, di indurre il differenziamento (276).

Notch è strettamente correlato anche ai tumori del sistema ematopoietico. Le prime informazioni a riguardo risalgono agli anni '80 e all'inizio del secolo scorso il gruppo di Jeff Sklar ha clonato e sequenziato la traslocazione cromosomica t(7;9) in un ristretto numero di soggetti affetti da Leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL, *T-cell Acute lymphoblastic leukemia*) (232). La traslocazione t(7;9), che porta all'espressione di una forma tronca del recettore Notch1 che risulta costitutivamente attiva, è rara e si riscontra in meno dell'1% dei pazienti con T-ALL, sollevando pertanto la questione della reale rilevanza clinica di questi dati. Tuttavia, uno studio recente ha identificato mutazioni attivanti a carico del gene codificante per Notch1 in oltre il 50% dei pazienti con T-ALL analizzati. Questi dati mostrano come le mutazioni attivanti di Notch1 siano una delle principali cause dello sviluppo di leucemia a cellule T (237) (276).

L'espressione aberrante e disregolata dei recettori Notch è stata dimostrata anche in linfociti tumorali sia T che B di pazienti affetti da Linfoma di Hodgkin e da Linfoma anaplastico a grandi cellule (299), suggerendo un possibile ruolo di questa via di segnalazione come marker diagnostico e come possibile obiettivo terapeutico. È interessante tuttavia notare come il potenziale oncogenico di Notch sembri confinato alle neoplasie della linea T e non abbia invece alcuna importanza in quelle delle cellule mieloidi. Il

motivo non è chiaro, ma è possibile che Notch cooperi con un segnale specifico per le cellule T (276).

- Intestino: diverse tipologie di studi (mutagenesi selettiva, inibizione o attivazione esogena, induzione di espressione forzata, etc.) hanno condotto ad alcune importanti acquisizioni sul ruolo di Notch nel sistema staminale intestinale, localizzato a livello delle cripte di Lieberkühn. L'inibizione del *signaling* di Notch comporta l'abolizione di attività proliferativa nelle TAC, cui consegue il loro differenziamento in cellule caliciformi mucipare o in cellule endocrine e perdita della capacità di acquisire il fenotipo enterocitario (300) (273). Al contrario, l'iperattivazione di Notch risulta nella inibizione del differenziamento delle cellule staminali residenti nelle cripte in cellule mature (301). Questi risultati consentono di identificare due importanti funzioni della via di segnalazione di Notch nell'omeostasi intestinale: la prima è il mantenimento dei progenitori in uno stato indifferenziato, la seconda è la regolazione della *binary cell fate choice* dei progenitori che devono scegliere tra il fenotipo secretorio (cellule mucipare o endocrine) e quello assorbente. Infine è stato dimostrato che il *signaling* di Notch è iperattivo nelle cellule di adenoma intestinale, suggerendo un possibile ruolo nell'oncogenesi di questo distretto (302).
- Muscolo scheletrico: Notch sembra rivestire diversi ruoli nella miogenesi. Nonostante l'attivazione della cascata di segnalazione sia responsabile della mancata formazione dei precursori miogenici dal mesoderma somatico, è tuttavia necessaria per lo sviluppo del sistema nervoso periferico, essenziale per il differenziamento terminale delle cellule muscolari (303). Oltre a questa funzione esplicita durante lo sviluppo embrionale, Notch è

responsabile del mantenimento dell'omeostasi del sistema staminale residente, rappresentato dalle cellule satelliti (304): l'up-regolazione del *signaling* di Notch comporta un incremento del *rate* proliferativo di queste cellule e quindi l'espansione del compartimento staminale, mentre al contrario la sua inibizione è associata al differenziamento in cellule muscolari mature (303). Inoltre è stato dimostrato che il declino della capacità rigenerativa e di riparazione del tessuto muscolare da parte delle cellule satellite, a cui si assiste con l'avanzare dell'età, può essere attribuito ad un'insufficiente attivazione del *signaling* di Notch e che l'induzione di un elevato livello di trasduzione del segnale è in grado di ripristinare tale capacità (303) (209) (305).

- Cuore: la via di segnalazione di Notch riveste importanti funzioni durante i processi morfogenetici cardiaci, come suggerito da evidenze sperimentali e, in particolare, dal riscontro di numerose malformazioni cardio-vascolari congenite, spesso incompatibili con la vita, in modelli di mutagenesi condotta a carico dei costituenti della *pathway*, e cliniche, ad esempio nella Sindrome di Alagille. Sia durante l'embriogenesi che nel sistema staminale adulto del cuore, l'attivazione del *signaling* di Notch è responsabile dell'espansione del *pool* staminale, ottenuta dalla proliferazione e dalla contemporanea prevenzione dell'apoptosi dei precursori (306) (27). I livelli di attivazione di Notch presentano un andamento parallelo al potenziale proliferativo dei cardiomiociti immaturi (306), tanto che il loro progressivo declino è associato alla concorde perdita della capacità replicativa dei precursori per uscita dal ciclo cellulare, che peraltro si accompagna al differenziamento in cellule mature (306).

Un dato di estremo rilievo per la comprensione dei meccanismi patogenetici e delle potenzialità terapeutiche di numerose malattie, peraltro non solo cardiache, è quello segnalato da Campa *e coll.*, secondo i quali l'attivazione forzata del *signaling* di Notch in cardiomiociti maturi e completamente differenziati comporta l'attivazione del *checkpoint* per il controllo del danno al DNA e l'arresto nella fase G2/M del ciclo cellulare, riflettendo l'esistenza di una barriera intrinseca alla replicazione di tali cellule: questo meccanismo ha lo scopo di prevenire nel cuore maturo il realizzarsi di processi quali l'apoptosi e la catastrofe mitotica, cui vanno incontro cellule che, per il loro elevato livello di specializzazione e differenziamento, non sono programmate per duplicarsi (27).

- Ghiandola mammaria: la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali della ghiandola mammaria, capaci di generare sia le cellule luminali che quelle del *lineage* mioepiteliale, sembrano almeno in parte regolati dalla attività della *pathway* di Notch; la sua inibizione, ad esempio, promuove il self-renewal mentre al contrario, la sua attivazione stimola il differenziamento in cellule luminali. È stato dimostrato che lo stretto controllo dell'attività di Notch è essenziale non solo per garantire un equilibrio nella produzione di cellule differenziate, ma anche per controllare la corretta progressione del ciclo cellulare e quindi proteggere le cellule ghiandolari dalla trasformazione neoplastica (202).
- Sistema nervoso: la via di segnalazione di Notch riveste numerosi importanti ruoli nello sviluppo sistema nervoso centrale (SNC), tra cui la regolazione della proliferazione, del self-renewal e del differenziamento delle cellule staminali neuronali: Notch mantiene le NSC nello stato proliferante (307),

ne previene la morte e ne conserva intatto il potenziale multidifferenziativo (308), mentre Numb, che antagonizza la funzione di Notch, promuove l'arresto del ciclo cellulare e il differenziamento neuronale (309) (310). In fasi successive, Notch sembra implicato nella regolazione della scelta tra distinte opzioni differenziative, come accade altrove: la sua attivazione sembra infatti promuovere l'acquisizione del fenotipo neuronale rispetto a quello gliale ed inoltre, nella popolazione che differenzia a cellule della glia, stimola il differenziamento in cellule di Muller, astrociti e cellule gliali radiali, piuttosto che in oligodendrociti (311).

Mentre i fenomeni rigenerativi che si riscontrano in altri tessuti, come il BM o l'epidermide, sono continui durante il corso di tutta la vita, la neurogenesi è un processo essenzialmente embrionale e nella vita adulta si realizza limitatamente ad alcune regioni, tra cui la SVZ, la SGZ e il bulbo olfattivo; ciò nonostante, può essere potenziata da stimoli quali l'esercizio, il danno o un ambiente opportuno (202). Nelle NSC adulte Notch promuove la proliferazione, inibendo l'uscita dal ciclo cellulare, previene il differenziamento e quindi contribuisce a mantenere il *pool* staminale (202). Notch è espresso e attivo anche nei neuroni post-mitotici differenziati del SNC dell'adulto (312): durante tutto il corso della vita, dalla nascita alla morte, Notch è attivamente coinvolto in cambiamenti dinamici dell'architettura cellulare e nella regolazione della funzione del sistema nervoso; controlla infatti la neurogenesi, la crescita degli assoni e dei dendriti, la plasticità sinaptica ed infine la morte neuronale, contribuendo a regolare importanti processi quali l'apprendimento e la memoria (313). Questo ruolo ha iniziato ad essere chiarito negli ultimi anni. Numerosi studi

hanno dimostrato che il *signaling* di Notch assolve importanti funzioni nel rimodellamento neuronale, come la crescita ed il mantenimento dei neuriti (l'attivazione di Notch inibisce la crescita dei neuriti o ne causa la retrazione, mentre la sua inibizione promuove l'estensione) e la morfogenesi dendritica (l'attivazione di Notch infatti inibisce l'allungamento ma stimola la ramificazione dei dendriti), influenzando l'espressione genica specificamente deputata (313).

Il *signaling* di Notch sembra inoltre coinvolto nella regolazione della plasticità sinaptica e dei processi a questa associati (ad esempio la LTP, *Long-term Potentiation*) che garantiscono importanti funzioni del SNC, quali l'apprendimento e la memoria. Tale collegamento è suggerito dal fatto che l'attivazione della cascata di traduzione del segnale di Notch prevede un taglio proteolitico da parte della Presenilina-1, le cui mutazioni sono associate con lo sviluppo di forme ereditarie di Malattia di Alzheimer (*Alzheimer's Disease, AD*) ad insorgenza precoce (314).

Numerosi gruppi di ricerca hanno poi studiato il possibile coinvolgimento di Notch nelle malattie neurologiche e nella risposta del SNC ad un danno inferto. I risultati ottenuti suggeriscono che il ruolo sia spesso complesso, coinvolgendo molti diversi tipi cellulari (neuroni, cellule della glia, cellule vascolari, linfociti) e determinando talvolta effetti contrastanti sul processo patogenetico e sull'*outcome* finale. Un esempio è rappresentato dai processi di ischemia-riperfusion che caratterizzano l'ictus ischemico. Durante la fase ischemica, il *signaling* di Notch potenzia l'apoptosi dei neuroni, mentre nelle cellule della glia e nei leucociti può esacerbare i processi infiammatori che contribuiscono a loro volta in modo significativo alla

morte neuronale, peggiorando così l'*outcome* dello stroke; al contrario, l'attivazione di Notch nelle NSC e nei progenitori può promuovere il recupero del danno: le NSC adulte infatti sono stimulate ad incrementare la proliferazione e successivamente a differenziare a neuroni maturi, che vanno ad integrarsi nei circuiti neuronali nell'area del danno (313).

Appare poi ragionevole sostenere che il *signaling* di Notch possa essere coinvolto anche nella genesi di processi patologici neuro-degenerativi, tra cui il più studiato è certamente la AD, mentre le conoscenze sul coinvolgimento nel Morbo di Parkinson, nella Sclerosi laterale amiotrofica e nella Corea Di Huntington sono ancora molto scarse.

Esistono infine importanti dati a sostegno del coinvolgimento di Notch anche nella progressione di alcuni tumori cerebrali. Data l'importanza del *signaling* di Notch nello sviluppo del SNC sembra plausibile infatti ipotizzare che questo regoli anche il comportamento delle così dette cellule staminali tumorali (*cancer stem cells*, ovvero cellule dotate di self-renewal, proprietà grazie alla quale danno origine sia ad altre staminali tumorali che a cellule più avanzate nella linea di differenziamento, e di tumorigenicità, cioè della capacità di dare inizio alla formazione di un tumore quando impiantate in ospiti immunocompromessi) e la progressione della malattia (313).

Dal momento che l'elenco dei sistemi staminali tessuto-specifici influenzati nelle loro funzioni da Notch si sta allungando, la definizione di questa via di segnalazione come "*the stem cell pathway*" può risultare forse esagerata, ma sicuramente giustificata. Da quanto descritto emerge infatti chiaramente che la via di

segnalazione di Notch appare per molti aspetti dotata delle caratteristiche ideali per rappresentare il mezzo di comunicazione tra le cellule staminali e l'ambiente circostante, che costituisce la nicchia staminale; è infatti altamente conservata dal punto di vista evolutivo, la sua attivazione richiede il contatto diretto tra cellule adiacenti ed è in grado di influenzare il destino delle cellule in cui opera (265). Costituisce pertanto un sistema in grado di fornire rapidamente alle cellule staminali informazioni e stimoli provenienti dall'ambiente che le circonda, garantendo quel livello di interazione e integrazione essenziale per la regolazione delle loro funzioni e quindi dell'omeostasi del tessuto di cui fanno parte. Da ciò si evince, inoltre, che la via di segnalazione di Notch può rappresentare un target interessante per mettere a punto tecniche di manipolazione delle cellule staminali finalizzate al trattamento di alcune patologie (202).

Quanto riferito a proposito dell'importanza e del ruolo pleiotropico di Notch nella regolazione e nel funzionamento di molti sistemi staminali umani, in associazione con la recente descrizione nel rene adulto di quello che può essere definito un "sistema renopoietico", ha suggerito l'opportunità di valutare la funzione di questa via di segnalazione anche a livello renale.

2 MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono state analizzate le sezioni di biopsie renali di quindici pazienti con diagnosi clinica di nefrite lupica, e di dieci pazienti affetti da FSGS. Porzioni macroscopicamente normali di tessuto renale sono state ottenute da otto pazienti sottoposti a nefrectomia per carcinoma renale, in accordo con le raccomandazioni del Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze, sulla sperimentazione umana.

Culture cellulari di progenitori renali umani e differenziamento *in vitro*

I progenitori renali umani sono stati ottenuti e posti in coltura come precedentemente descritto (20) (21) (22) (157) (315). Per ottenere il differenziamento a podociti, le cellule sono state trattate per 2 giorni con il mezzo di coltura VRADD, che è composto da DMEM-F12 (Sigma, ST. Louis, MO) supplementato con FBS 10% (Hyclone Laboratories, South Logan, UT), vitamina D3 100 nM, acido retinoico tutto-*trans* 100 µM e desametasone 0.1 µM (tutto Sigma).

Saggi di proliferazione cellulare.

L'incorporazione di timidina triziata 3[H]-timidina è stata valutata come precedentemente descritto (316). Le cellule sono state esposte a differenti concentrazioni dell'inibitore delle γ -secretasi IX DAPT (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany).

Infezione dei progenitori umani

N1ICD (5275-7332 bp), N2ICD (5094-7413 bp) e N3ICD (4954-6996 bp) sono stati amplificati mediante PCR dal cDNA ottenuto dai progenitori renali e quindi clonati nel vettore lentivirale bicistronico pLVX-IRES-sGreen1 (Clontech, Mountain View, CA), che consente al gene di interesse ed alla proteina fluorescente ZsGreen1 di essere espressi contemporaneamente a partire da un singolo trascritto di mRNA.

Le particelle lentivirali sono state prodotte per co-transfezione dei lentivirus e di 3 vettori di packaging di terza generazione (pMD2.G, pRSV-Rev e pMDLg-pRRE) nelle cellule Lenti-X 293T (Clontech). I titoli sono stati determinati dall'infezione con cellule 293T e sono risultati compresi nel range da 0.2 a 2×10^6 particelle infettive per ml.

I progenitori renali umani sono stati infettati con il surnatante contenente il virus con *multiplicity of infection* (MOI) di 10 ed il medium EGM-MV fresco, in presenza di polybrene 8 µg/mL (Sigma). I livelli di infezione sono stati valutati misurando le percentuali di cellule ZsGreen1⁺ tramite citofluorimetria. Tali percentuali variavano dal 40 al 90%.

Sistema reporter RBP-J

Il plasmide reporter pGF1-Notch, che esprime la luciferasi di lucciola sotto il controllo di RBP-J, ed il vettore vuoto di controllo sono stati ottenuti da System Biosciences, SBI, California, USA. Le particelle lentivirali sono state prodotte come precedentemente descritto ed i progenitori renali umani sono stati infettati con un MOI di 30.

Analisi del ciclo cellulare e dello staining PI/annessina V

L'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita come precedentemente descritto (316). I dati sono stati analizzati con il software Modfit LT 3.0 (Verity Software House Inc., Topsham, ME). Le cellule apoptotiche e/o necrotiche sono state identificate tramite un doppio staining sopravvitalo con annessina V e ioduro di propidio (PI) (BD Biosciences, San Diego, CA). Le cellule sono quindi state analizzate con il citofluorimetro BD LSRII (BD Biosciences) usando il software FACSDiva.

Immunofluorescenza e microscopia confocale

La microscopia confocale è stata eseguita su sezioni di 5 µm di tessuti renali congelati o su cellule in coltura, utilizzando il microscopio confocale LSM510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany), come precedentemente descritto (20) (21) (157). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-Notch1 pAb Val1744 (diretto contro NICD), anti-Notch3 pAb (diretto contro NICD), anti-Dll4 pAb (tutti Abcam, Cambridge, UK); anti-Notch2 pAb (diretto contro NICD, Rockland, Gilbertsville, PA); anti-Notch1 pAb C-20 (diretto contro NICD), anti-Jag1 pAb, anti-Jag2 pAb, anti-nefrina pAb, anti-CD24 mAb (clone SN3), anti-WT1 mAb (clone F-6) (tutti Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-Hes1 pAb (Chemicon, Temecula, CA); anti-Dll1 mAb (clone 251123, R&D Systems, Minneapolis, MN,); anti-H3-Ser10 mAb (anti-*phospho histone H3*, Abcam); anti-Claudina-1 mAb (clone 2H10D10, Invitrogen); anti-H3-Ser10 pAb (Cell Signalling, Danvers, MA); anti- α -tubulina mAb (clone B512, Sigma); anti-PDX mAb (clone 222328, R&D Systems); anti-citocheratina mAb (CK, clone C-2562, Sigma). Lo staining con falloidina Alexa

Fluor546 (Molecular Probes, Eugene, OR) è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore. L'immunofluorescenza doppia è stata eseguita come descritto. Gli anticorpi secondari Alexa Fluor sono stati ottenuti da Molecular Probes.

Analisi della morfologia renale e quantificazione delle cellule positive per nefrina e delle cellule mitotiche

Per l'analisi della morfologia renale murina, sono state valutate sezioni dello spessore di 5 µm di reni di topi trattati con DAPT e con il veicolo (olio di mais), uccisi ai giorni 7 e 21. Allo scopo di quantificare il numero di podociti è stata eseguita una immunofluorescenza per il marker nefrina, mentre il numero di podociti in mitosi è stato valutato tramite la doppia immunofluorescenza per H3-Ser10 e nefrina. Sono stati valutati 15 glomeruli in almeno 4 sezioni per ogni topo da due operatori indipendenti.

Microscopia elettronica di trasmissione

Campioni di tessuto renale di circa 2 mm³ ottenuti da 4 topi trattati con DAPT e da 4 trattati con il veicolo sono stati fissati con tetrossido di osmio e glutaraldeide, inclusi in resina epossidica e processati per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Sezioni ultra-fini sono state ottenute utilizzando l'ultramicrotomo LKB-Nova (LKB, Bromma, Sweden), contro-colorate con acetato di uranile e sub-nitrato di bismuto alcalino ed esaminate tramite il microscopio elettronico a trasmissione JEM 1010 (Jeol, Tokyo, Japan) a 80 kV.

RT-PCR quantitativa Real-Time

La RT-PCR Taq-Man è stata eseguita come precedentemente descritto (317). La quantificazione di Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Dll1, Dll3, Dll4, Jag1, Jag2, Hes1, Hes2, Hes3, Hes4, Hes5, Hes6, Hes7, Hey1, Hey2, HeyL, nefrina, p21, p27 e Aurora kinase B è stata eseguita utilizzando kit Assay on Demand (Applied Biosystems, Warrington, UK).

Modello di nefropatia indotta da adriamicina in topi SCID

Gli esperimenti sugli animali sono stati condotti nel rispetto delle linee-guida istituzionali, regionali e nazionali ed in accordo con il National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

La nefropatia da adriamicina è stata indotta in topi SCID femmina (Harlan, Udine, Italy) all'età di sei settimane attraverso una singola iniezione intravenosa di adriamicina (6 mg/kg in PBS, Sigma) eseguita al giorno 0 nella vena della coda ($n=12$) in un totale di tre esperimenti indipendenti. Come controllo, un altro gruppo di topi ($n=12$) ha ricevuto PBS. La proteinuria è stata valutata al giorno 0 e successivamente ai giorni 7, 14, 21, 28, 35 e 42 nei topi SCID trattati sia con adriamicina che con PBS. In ciascun esperimento, 28 ulteriori topi, trattati come descritto precedentemente, sono stati uccisi ai giorni 0 ($n=4$), 7 ($n=4$), 14 ($n=4$), 21 ($n=4$), 28 ($n=4$), 35 ($n=4$), 42 ($n=4$) per l'analisi della morfologia renale e per l'esecuzione dell'immunofluorescenza per Notch.

Per chiarire il ruolo della via di segnalazione di Notch nel danno podocitario e nella rigenerazione glomerulare, un gruppo aggiuntivo di topi ha ricevuto un *gavage* orale di DAPT (5 mg/kg in olio di mais, Calbiochem) o del veicolo (olio di mais) una volta al giorno, per tutto il periodo compreso tra 2 giorni prima della data dell'iniezione di

adriamicina fino alla fine dell'esperimento, come segue: gruppo 1, veicolo ($n=15$); gruppo 2, DAPT ($n=15$), in un totale di tre esperimenti indipendenti. In ciascun esperimento, 20 ulteriori topi trattati come descritto sopra sono stati sacrificati ai giorni 7 ($n=5$), 14 ($n=5$), 21 ($n=5$), e 28 ($n=5$) dall'iniezione di adriamicina per l'analisi della morfologia renale. L'albumina e la creatinina urinarie sono state misurate nelle urine delle 24 ore con kit Albuwell M (Exocell, Philadelphia, PA) e Creatinine Assay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media \pm SEM. Il confronto tra i due gruppi è stato eseguito con il test di Mann-Whitney, il test di Wilcoxon o tramite l'analisi della varianza per comparazioni multiple (ANOVA per ripetute misurazioni). $P<0.05$ è stata considerata statisticamente significativa.

3 RISULTATI

L'attivazione di Notch induce la proliferazione dei progenitori renali

Allo scopo di indagare il possibile ruolo della via di segnalazione di Notch nella regolazione della crescita e del differenziamento dei progenitori renali, è stato innanzitutto esaminato il profilo di espressione dei ligandi e dei recettori di Notch, sia a livello di mRNA che di proteina, in progenitori renali umani in coltura, mediante RT-PCR quantitativa con metodica TaqMan ed immunofluorescenza e microscopia confocale, rispettivamente.

Le cellule in studio sono risultate positive per l'espressione dei recettori Notch1, Notch2 e Notch3, mentre l'espressione di Notch4 è risultata non rilevante (Figura 16A-B). I livelli di espressione dell'mRNA di Notch2 erano significativamente più elevati di quelli di Notch1 e Notch3 ($P < 0,05$).

I ligandi di Notch (Dll1, Dll3, Dll4, Jag1 e Jag2) sono risultati espressi dai progenitori renali umani a differenti livelli di intensità: i più alti livelli di espressione sono risultati quelli di Jag1 ($P < 0,05$), mentre Jag2 è risultato espresso a livelli maggiori rispetto a Dll1 and Dll4 ($P < 0,05$; Figura 16C-D) e al contrario l'espressione di Dll3 è risultata non valutabile (Figura 16C).

Dal momento che l'attivazione di Notch comporta la traslocazione nucleare del frammento NICD e la sua conseguente associazione con le proteine leganti il DNA della famiglia RBP-J, determinando in tal modo la de-repressione e/o l'attivazione di geni a valle, è stata valutata anche l'espressione delle proteine Notch1, Notch2 e Notch3 all'interno del nucleo delle cellule utilizzando anticorpi specifici per la

porzione NICD dei recettori: il riscontro del segnale relativo a tali molecole nel nucleo cellulare ha suggerito che la via di segnalazione di Notch era attiva nella maggior parte dei progenitori renali in coltura.

In accordo con tali dati, l'infezione di progenitori renali umani con un vettore codificante per la luciferasi, il cui segnale è determinato dall'attività di RBP-J, ha indotto in tali cellule un'attivazione del reporter dipendente da RBP-J, confermando ulteriormente la attivazione costitutiva della *pathway* di Notch in queste cellule (Figura 16E).

Successivamente è stato indagato il ruolo della via di segnalazione di Notch nella regolazione della proliferazione dei progenitori renali. A tal fine, queste cellule sono state esposte a differenti concentrazioni dell'inibitore delle γ -secretasi DAPT, che sopprime la segnalazione mediata da tutti i sottotipi recettoriali. I saggi di incorporazione di ^3H -timidina hanno mostrato che il trattamento dei progenitori renali con DAPT è in grado di indurre un'inibizione dose-dipendente della crescita cellulare (Figura 16F), risultante in una riduzione del numero di progenitori renali (Figura 16G). Una diminuzione dell'incorporazione di ^3H -timidina è indice di una ridotta capacità delle cellule di sintetizzare DNA, la quale può essere la conseguenza o di una diminuzione della capacità proliferativa delle cellule, o di un aumento del numero di cellule apoptotiche o necrotiche. Quindi, per verificare se l'effetto del DAPT sull'incorporazione della ^3H -timidina fosse dovuto ad una diminuzione della proliferazione o ad un effetto tossico della molecola, la vitalità delle colture di progenitori renali è stata analizzata al citofluorimetro dopo marcatura combinata con PI ed annessina V. La positività per l'annessina V indica cellule apoptotiche, mentre la doppia positività per annessina V e PI è una caratteristica delle cellule necrotiche. Utilizzando questo tipo di analisi abbiamo potuto dimostrare che la vitalità delle

cellule trattate con DAPT 10 μ M era comparabile con quella delle cellule non trattate (94.6% \pm 0.7 vs. 93.6% \pm 0.9; *NS*), come dimostrato dall'analisi FACS della marcatura combinata con PI e annessina V (Figura 16H), suggerendo pertanto che l'inibizione della *pathway* di Notch non è associata ad una riduzione della vitalità dei progenitori renali.

Considerati complessivamente, questi dati dimostrano che l'attivazione di Notch induce la proliferazione dei progenitori renali umani.

La *down-regulation* di Notch non è necessaria per il differenziamento dei progenitori renali in podociti ma è essenziale per la loro sopravvivenza

I progenitori renali umani costituiscono una popolazione multipotente capace di differenziare verso il *lineage* podocitario se posta in appositi mezzi di coltura, come ad esempio VRADD. In accordo con quanto riferito in studi precedenti (22), il differenziamento dei progenitori renali in podociti è segnalato dall'acquisizione dell'espressione di marcatori podocitari, tra i quali la nefrina è considerata il più specifico (Figura 17A).

Il differenziamento dei progenitori renali in podociti è risultato associato ad una riduzione dell'espressione delle proteine Notch 1-3 (Figura 17B) e ad una *down-regulation* dei geni target di Notch, Hes1 ed Hes5 (Figura 17C). Concordemente, è stata rilevata anche una diminuzione dell'attivazione del reporter RBP-J-dipendente (Figura 17D). Il riscontro di una ridotta espressione dei soli geni target Hes1 ed Hes5, e non di altri, è in accordo con osservazioni ottenute dallo studio di altre popolazioni di cellule staminali/progenitori, nelle quali è stato dimostrato che gli effetti della *pathway* di Notch su proliferazione e differenziamento sono specificamente mediate da Hes1 e/o Hes5 (291) (318) (319).

In molti diversi sistemi staminali, l'inibizione della via di segnalazione di Notch è associata al differenziamento dei progenitori in cellule mature. Allo scopo di valutare l'esistenza di questa associazione anche nei progenitori renali umani, le cellule sono state esposte a DAPT per 48 ore e ne è stato successivamente valutato il profilo di espressione, in particolare per quanto riguarda i marcatori di differenziamento podocitario. Il trattamento con DAPT ha determinato l'inibizione della via di segnalazione di Notch, come dimostrato dal decremento nei livelli di espressione dell'mRNA di Hes1 (dati non mostrati), mentre l'espressione del marker podocitario nefrina non è risultata influenzata dall'esposizione al DAPT (Figura 17E), dimostrando quindi che la *down-regulation* della *pathway* di Notch non è sufficiente ad indurre il differenziamento dei progenitori renali a podociti.

Per valutare se però la *down-regulation* della *pathway* in studio sia comunque necessaria al raggiungimento di tale obiettivo, l'inibizione della via di segnalazione di Notch, che dunque fisiologicamente caratterizza i progenitori che intraprendono il differenziamento, è stata contrastata mediante l'induzione di una segnalazione sostenuta, ottenuta tramite l'infezione dei progenitori renali con un lentivirus ricombinante codificante per il dominio intracellulare NCID dei tre recettori Notch1, 2 e 3: N1CID, N2CID o N3CID (Figura 18A). L'infezione delle cellule, e la conseguente aumentata attività della *pathway* di Notch, ha generato una *up-regulation* della transattivazione di RBP-J (Figura 18B).

I progenitori infettati con i lentivirus codificanti gli NCID e la popolazione di controllo, rappresentata dai progenitori infettati con il vettore vuoto (mock), sono stati successivamente indotti a differenziare a podociti (Figura 18B). Il trattamento con VRADD ha determinato un silenziamento pressoché completo della *pathway* di Notch nei progenitori infettati con il mock, mentre ha prodotto solo minimi effetti

nelle cellule infettate con NCID (Figura 18B). Il processo di differenziamento si è svolto inoltre normalmente nei progenitori infettati con il mock, mentre è risultato fortemente perturbato in quelli infettati con NCID (Figura 18 C, D). Infatti, la maggior parte dei progenitori renali infettati con NCID si staccava dalla piastra di coltura e moriva durante il processo differenziativo a podociti. (Figura 18D). Ciò nonostante, al termine del differenziamento le poche cellule sopravvissute esprimevano livelli di nefrina paragonabili a quelli della popolazione di controllo (Figura 18C). Gli effetti riscontrati sono risultati indipendenti dal tipo di NICD (Figura 18C, D) e dai livelli di transattivazione di RBP-J ottenuti.

In aggiunta a quanto descritto, è stato dimostrato che un pressoché totale esaurimento dell'attività di Notch è necessario per evitare la morte dei progenitori renali durante il loro differenziamento a podociti. Infatti, nei progenitori indifferenziati un livello di attività di Notch costantemente elevato non aveva alcun effetto sulla sopravvivenza e promuoveva la crescita di queste cellule, mentre si è dimostrato incompatibile con il loro differenziamento a podociti maturi, suggerendo che l'effetto dell'attivazione di Notch nel promuovere la morte dei podociti sia specifico per il tipo cellulare e non correlato con l'over-espressione di tale via di segnalazione.

Questi dati suggeriscono che lo spegnimento della via di segnalazione di Notch durante il differenziamento non sia richiesto per l'acquisizione del fenotipo di podocita maturo da parte delle cellule progenitrici renali, ma è tuttavia necessario per evitare la morte dei podici già differenziati.

L'attivazione di Notch regola in modo diverso la progressione del ciclo cellulare e l'arresto ai *checkpoint* nei progenitori renali e nei podociti

Allo scopo di studiare i meccanismi che sottendono i diversi effetti della via di segnalazione di Notch sulla crescita/sopravvivenza dei progenitori renali umani, prima e dopo il differenziamento a podociti, è stata effettuata una valutazione della distribuzione nel ciclo cellulare dei progenitori renali umani infettati con il mock e con gli NCID, mantenuti in condizioni indifferenziate o indotti a differenziare a podociti.

A tal fine, le cellule sono state sincronizzate tramite il distacco e la piastratura in un medium di coltura basale, che subito dopo l'adesione è stato cambiato. I progenitori sono stati mantenuti nel medium di base o, in alternativa, trattati con un medium per il differenziamento a podociti. L'analisi della distribuzione del ciclo cellulare condotta 48 ore dopo ha dimostrato che nei progenitori renali indifferenziati la percentuale di cellule infettate con NCID che si trovava in fase S era significativamente maggiore in confronto a quella riscontrata nelle cellule infettate con il mock (36.5 ± 2.7 vs. 19.8 ± 2.5 , $P < 0.05$; Figura 19A vs. 19B). Al contrario, quando i progenitori renali infettati con il mock erano indotti a differenziare a podociti, si osservava una loro sincronizzazione nella fase G2/M del ciclo cellulare (30.8 ± 6.5 vs. 8.7 ± 2.6 , $P < 0.05$; Figura 19C vs. 19A). Questo risultato è in accordo con precedenti osservazioni (320) e suggerisce che i podociti differenziati, in presenza di fattori promuoventi la crescita, si arrestano al *checkpoint* G2/M del ciclo cellulare. Tuttavia, se i progenitori infettati con NCID erano indotti a differenziare in podociti, si osservava una sostanziale riduzione del numero di cellule nella fase G2/M del ciclo cellulare (11.7 ± 1.9 vs. 30.8 ± 6.5 , $P < 0.05$; Figura 19C vs. 19D) ed un

concomitante loro significativo distacco dalla piastra. Un effetto sovrapponibile era osservato indipendentemente dal tipo di NICD utilizzato per l'infezione.

Questi risultati suggeriscono che elevati livelli di attivazione del *signaling* di Notch durante il differenziamento a podocita inducono il superamento del *checkpoint* G2/M e promuovono la morte cellulare. A supporto di questa ipotesi, è stata valutata, tramite analisi FACS della marcatura combinata per PI e annessina V, la percentuale di progenitori e podociti apoptotici e/o necrotici tra le cellule infettate con mock o con NICD (Figura 19E-H). La percentuale di cellule morte è stata analizzata includendo le cellule adese e le cellule distaccate presenti nel surnatante. I progenitori renali hanno mostrato una percentuale trascurabile di cellule morte, indipendentemente dai livelli di espressione di Notch (Figura 19E-F). In contrasto, dopo il differenziamento a podociti, l'espressione di NICD ha determinato un aumento della percentuale di cellule morte nei progenitori infettati con NICD rispetto a quelli infettati con il mock (5.1 ± 0.9 vs. 21.1 ± 2.1 , $P < 0.05$; Figura 19G vs. 19H), suggerendo pertanto che un'attivazione sostenuta di Notch è incompatibile con una corretta progressione dei podociti attraverso le varie fasi della divisione mitotica.

Per chiarire meglio questo punto, è stata effettuata una valutazione dell'aspetto morfologico delle divisioni mitotiche nei progenitori renali prima e dopo il differenziamento a podociti, utilizzando una doppia immunofluorescenza per l'istone H3-serina10 fosforilato (H3-Ser10), un marcatore di mitosi, e per la tubulina, un componente del fuso mitotico. Nei progenitori renali infettati con il mock sono state osservate mitosi normali, una struttura del citoscheletro conservata ed una normale ploidia nucleare (Figura 19I), non influenzate dall'infezione con NICD (Figura 19J). Al contrario, a seguito del differenziamento a podociti, i progenitori infettati con NICD mostravano la presenza di mitosi aberranti, cellule binucleate o micro-nucleate

e un citoscheletro disgregato (Figura 19L) in confronto con i loro rispettivi controlli infettati con il mock (Figura 19K).

Considerati nel complesso, questi risultati dimostrano che l'attivazione di Notch induce la progressione attraverso il ciclo cellulare e la proliferazione nei progenitori renali umani, mentre nei podociti rappresenta uno stimolo in grado di indurre la morte, che si verifica attraverso un processo noto come catastrofe mitotica.

Per assicurare la corretta progressione attraverso ogni fase del ciclo cellulare, le cellule dispongono di una serie altamente organizzata di *checkpoint*, regolati da specifiche protein-kinasi, tra cui si annoverano gli inibitori del ciclo cellulare p21^{Cip1/WAF-1} e p27^{Kip1}, così come i membri della famiglia Aurora kinasi B, che riveste un ruolo cruciale nella regolazione dell'ingresso in mitosi e della segregazione cromosomica, che garantiscono una corretta formazione delle cellule figlie.

Per stabilire la ragione dei differenti effetti dell'attivazione di Notch sulla divisione mitotica nei progenitori renali indifferenziati ed in quelli che hanno compiuto il differenziamento a podociti, è stata effettuata una valutazione del profilo di espressione di entrambi i gruppi cellulari in studio, in particolare con misurazione dei livelli di mRNA specifici dei regolatori del ciclo cellulare p21^{Cip1/WAF-1}, p27^{Kip1} e Aurora kinasi B tramite RT-PCR quantitativa real time. L'infezione dei progenitori renali con NICD risultava in un consistente aumento della trascrizione dell'Aurora kinasi B ($P < 0.05$ vs. mock; Figura 19M), così come nella *down-regulation* dell'inibitore del ciclo cellulare p27^{Kip1} ($P < 0.05$ vs. mock; Figura 19N), che è uno dei principali regolatori del *checkpoint* G1/S. Al contrario, il differenziamento dei progenitori renali in podociti determinava una forte riduzione della trascrizione dell'Aurora kinasi B ($P < 0.05$ Figura 19O vs. mock in 19M) ed una *up-regulation*

degli inibitori del ciclo cellulare p21^{Cip1/WAF-1} e p27^{Kip1} ($P < 0.05$ Figura 19P vs. mock in 19N), risultato concorde con l'incapacità dei podociti di dividersi e con il loro arresto al *checkpoint* G2/M. Invece, nei podociti infettati con gli NICD si osservava un livello di trascrizione degli inibitori del ciclo cellulare p21^{Cip1/WAF-1} e p27^{Kip1} ridotto rispetto ai podociti infettati con il mock ($P < 0.05$ vs. mock; Figura 19P), suggerendo che la progressione attraverso il ciclo cellulare non poteva essere arrestata. Inoltre, in presenza dei bassi livelli di Aurora kinasi B riscontrati ($P < 0.05$ vs. mock; Figura 19O), le cellule non potevano assemblare un fuso mitotico funzionale e pertanto superavano il *checkpoint* G2/M e progredivano in una mitosi aberrante. Simili effetti si osservavano indipendentemente dal tipo di NICD utilizzato e dai livelli di attivazione di Notch raggiunti.

Nel complesso questi dati dimostrano che l'attivazione di Notch nei progenitori renali umani indifferenziati determina un incremento dell'espressione di Aurora kinasi B ed induce la progressione attraverso il ciclo cellulare e pertanto la divisione. Al contrario, nei podociti maturi, che esprimono livelli trascurabili di Aurora kinasi B, l'attivazione di Notch induce la progressione attraverso il ciclo cellulare in cellule che non sono in grado di organizzare un fuso mitotico funzionale, provocando in tal modo la loro morte per catastrofe mitotica.

Attivazione della via di segnalazione di Notch nei progenitori renali e nei podociti in pazienti affetti da disordini glomerulari correlati al danno podocitario

La valutazione dell'espressione dei componenti della via di segnalazione di Notch in reni normali e patologici, è stata effettuata eseguendo immunofluorescenze per Notch1, Notch2 e Notch3 su reni umani normali o su biopsie renali di pazienti affetti

da differenti tipi di disordini glomerulari caratterizzati da un danno podocitario severo, come ad esempio quello della nefrite lupica o della FSGS (Figura 20). La localizzazione di Notch1, Notch2 e Notch3 nei podociti o nei progenitori renali è stata determinata utilizzando una immunofluorescenza combinata per podocalixina (PDX), che marca fortemente i podociti e, anche se ad un livello inferiore, le cellule endoteliali, o per il marcatore dei progenitori renali CD24. Per Notch1, Notch2 e Notch3 sono stati utilizzati anticorpi che riconoscevano selettivamente il dominio intracellulare del recettore, consentendo in tal modo l'identificazione delle cellule in cui la via di segnalazione di Notch era attivata. L'espressione di Notch1 e Notch3 è risultata pressoché non valutabile nei reni normali (Figura 20A-B), ma chiaramente evidenziabile nel nucleo dei podociti dei glomeruli di pazienti affetti da nefrite lupica o FSGS, come dimostrato dalla doppia marcatura con PDX (Figura 20D, F). Risultati simili sono stati osservati anche per Notch2, nonostante questo recettore fosse espresso a livelli più bassi (dati non mostrati). Inoltre, Notch3 è risultato espresso nel nucleo dei progenitori renali della capsula di Bowman, come dimostrato dal *co-staining* con CD24 (Figura 20G-H), mentre l'espressione di Notch1 è stata rinvenuta più raramente (Figura 20E). In accordo con questi risultati, l'espressione di Hes1 era scarsa e limitata a poche cellule nel glomerulo dei reni sani (Figura 20C) mentre risultava elevata nei podociti, così come nei progenitori renali, dei pazienti affetti da nefrite lupica o FSGS (Figura 20I-J).

Questi risultati dimostrano che la *pathway* di Notch è attivata nei podociti così come nei progenitori renali di pazienti con patologie caratterizzate da un danno podocitario esteso, come le nefrite lupica o la FSGS, suggerendone un possibile coinvolgimento nella patogenesi delle malattie glomerulari.

L'inibizione di Notch regola differentemente il danno e la rigenerazione podocitaria in topi affetti da FSGS

Al fine di valutare *in vivo* il ruolo della *pathway* di Notch nella regolazione delle proprietà rigenerative dei progenitori renali a seguito del danno podocitario, è stato utilizzato un modello murino di danno renale cronico proteinurico, la nefropatia indotta da adriamicina, considerata un analogo sperimentale della FSGS (7). Nella nefropatia da adriamicina i linfociti T contribuiscono al danno renale ed è noto che la *pathway* di Notch svolge un ruolo cruciale anche nella regolazione della funzione di queste cellule (7) (321): pertanto, per valutare il ruolo della via di segnalazione di Notch nel danno e nella rigenerazione renali indipendentemente dall'interferenza dei linfociti T, è stato scelto di utilizzare come modello sperimentale il topo SCID. Nonostante l'assenza di linfociti T, i topi SCID trattati con adriamicina sviluppavano modificazioni funzionali e istologiche comparabili con quelle dei topi immunocompetenti, mostrando a 7 giorni dalla somministrazione del farmaco una proteinuria significativa, che raggiungeva il picco tra il 14° e il 21° giorno e successivamente decresceva, stabilizzandosi a livelli patologici dopo 28 giorni, quando la glomerulosclerosi era già sviluppata nella maggior parte dei glomeruli (Figura 21A). In accordo con i risultati ottenuti nei tessuti umani, l'attivazione di Notch non era rinvenibile nei topi SCID sani (Figura 21B). Sette giorni dopo la somministrazione di adriamicina si è osservata un'attivazione di Notch1 e Notch3 nei podociti glomerulari dei topi trattati, come dimostrato dalla doppia immunofluorescenza per Notch1 e Notch3 e per il marker podocitario WT1 (Figura 21B). Al contrario, i progenitori renali della capsula di Bowman erano raramente marcati, come dimostrato dalla doppia immunofluorescenza per Notch1 e Notch3 e per il marker dei progenitori renali murini (150) (321) Cludina-1 o citocheratina

(Figura 21B). Dopo 21 giorni, l'attivazione di Notch1 e Notch3 è risultata persistente (Figura 21B). Ancor più importante, una forte attivazione di Notch3 era osservabile nei progenitori renali (Figura 21B), mentre il segnale relativo a Notch1 era raramente rinvenibile (Figura 21B).

Per valutare il ruolo della *pathway* di Notch nel danno renale e nella rigenerazione, i topi SCID affetti da nefropatia da adriamicina sono stati trattati con DAPT o con il suo veicolo. I topi con nefropatia da adriamicina mostravano livelli del rapporto albumina/creatinina urinarie elevati e non influenzati dall'iniezione del veicolo (Figura 22A). Al contrario, l'iniezione di DAPT induceva una riduzione della proteinuria dopo 7 giorni di trattamento; tuttavia, in tempi successivi, i topi trattati con DAPT hanno mostrato un rilevante peggioramento della proteinuria, come evidenziato dai livelli significativamente più elevati del rapporto albumina/creatinina (Figura 22A). Curiosamente, gli effetti del DAPT erano maggiormente evidenti quando la proteinuria risultava più severa. Nel danno renale acuto (7° giorno), il miglioramento della proteinuria indotto dall'iniezione di DAPT era associato con una riduzione del danno glomerulare, dimostrata dalle colorazioni con acido periodico-reattivo di Schiff (PAS) su sezioni di rene (Figura 22B). Inoltre, mentre nei topi trattati con il veicolo si osservava una riduzione del numero di podociti, identificati come cellule esprimenti la nefrina, presenti a livello glomerulare, nessuna differenza era riscontrabile nei topi trattati con DAPT (Figura 22B). Nella doppia immunofluorescenza con H3-Ser10 e Claudina-1 si evidenziavano soltanto pochi progenitori proliferanti, suggerendo che la risposta rigenerativa di queste cellule non fosse ancora avviata (Figura 22C). Al contrario, nei reni dei topi affetti da danno cronico (21° giorno), il peggioramento della proteinuria indotto dall'iniezione di DAPT era associato ad un danno glomerulare aumentato, come dimostrato dalle

sezioni marcate con PAS, in confronto ai topi trattati con veicolo (Figura 22D). In accordo, nei topi trattati con DAPT il numero di podociti risultava ridotto (Figura 22D), mentre in quelli trattati con il veicolo era significativamente aumentato ed inoltre più elevato di quello osservato negli stessi animali al giorno 7. Questi risultati suggeriscono che al 21° giorno nei topi trattati col veicolo si erano rigenerati nuovi podociti e che il danno podocitario era stato almeno in parte riparato (Figura 22D). In accordo, la doppia immunofluorescenza per H3-Ser10 e per Claudina-1 eseguita al 21° giorno ha dimostrato la presenza di numerosi progenitori renali proliferanti nella capsula di Bowman dei topi trattati con il veicolo (Figura 22E) suggerendo che era in corso una risposta rigenerativa sostenuta da queste cellule. Straordinariamente, nei topi trattati con DAPT si osservava una riduzione del numero di progenitori renali proliferanti a livello della capsula in confronto ai topi trattati col veicolo (Figura 22E).

Per caratterizzare più accuratamente la risposta al danno podocitario, è stata eseguita una doppia immunofluorescenza per H3-Ser10 e nefrina (Figura 22F). Nei topi affetti da nefropatia da adriamicina era possibile osservare la presenza di alcuni podociti in mitosi a tutti i tempi analizzati (Figura 22F); tuttavia, tali cellule sono risultate spesso caratterizzate da un'alterata distribuzione del segnale H3-Ser10 e talvolta da micro/multi nucleazione, suggerendo che stavano probabilmente effettuando una mitosi anomala. Per verificare questa ipotesi è stata eseguita un'analisi in microscopia elettronica, che ha confermato che i podociti proliferanti andavano incontro a mitosi aberranti (Figura 22G). Per valutare la frequenza con cui questi eventi si verificavano, è stata eseguita una quantificazione del numero di mitosi aberranti osservate nei podociti, a diversi intervalli temporali. Nei topi affetti da nefropatia da adriamicina trattati con il veicolo si è rilevata un'elevata frequenza di

podociti in mitosi, in numero maggiore nelle fasi iniziali del processo ($3.1 \pm 0.3/\text{glomerulo}$ al giorno 7 vs. $2.3 \pm 0.2/\text{glomerulo}$ al giorno 21: $P < 0.05$). Oltre il 70% delle figure mitotiche mostrava aberrazioni maggiori a tutti i tempi analizzati ($73.8 \pm 18.3\%$ al giorno 7 vs. $71.5 \pm 14.1\%$ al giorno 21: *NS*), consentendo di confermare così che nel podocita la mitosi rappresenta un evento in grado di indurre la morte cellulare. Il trattamento con DAPT riduceva il numero di mitosi nei podociti ($3.1 \pm 0.3/\text{glomerulo}$ vs. $1.4 \pm 0.3/\text{glomerulo}$ al giorno 7: $P < 0.05$; $2.3 \pm 0.2/\text{glomerulo}$ vs. $1.1 \pm 0.3/\text{glomerulo}$ al giorno 21: $P < 0.05$).

Nel loro complesso questi risultati suggeriscono che in modelli murini di FSGS l'inibizione della *pathway* di Notch riduce la perdita dei podociti e quindi il danno morfologico e funzionale del rene nelle fasi iniziali del danno podocitario, mentre al contrario, durante la fase rigenerativa del danno glomerulare cronico, comporta un decremento della proliferazione dei progenitori renali, peggiorando pertanto la proteinuria e la glomerulosclerosi.

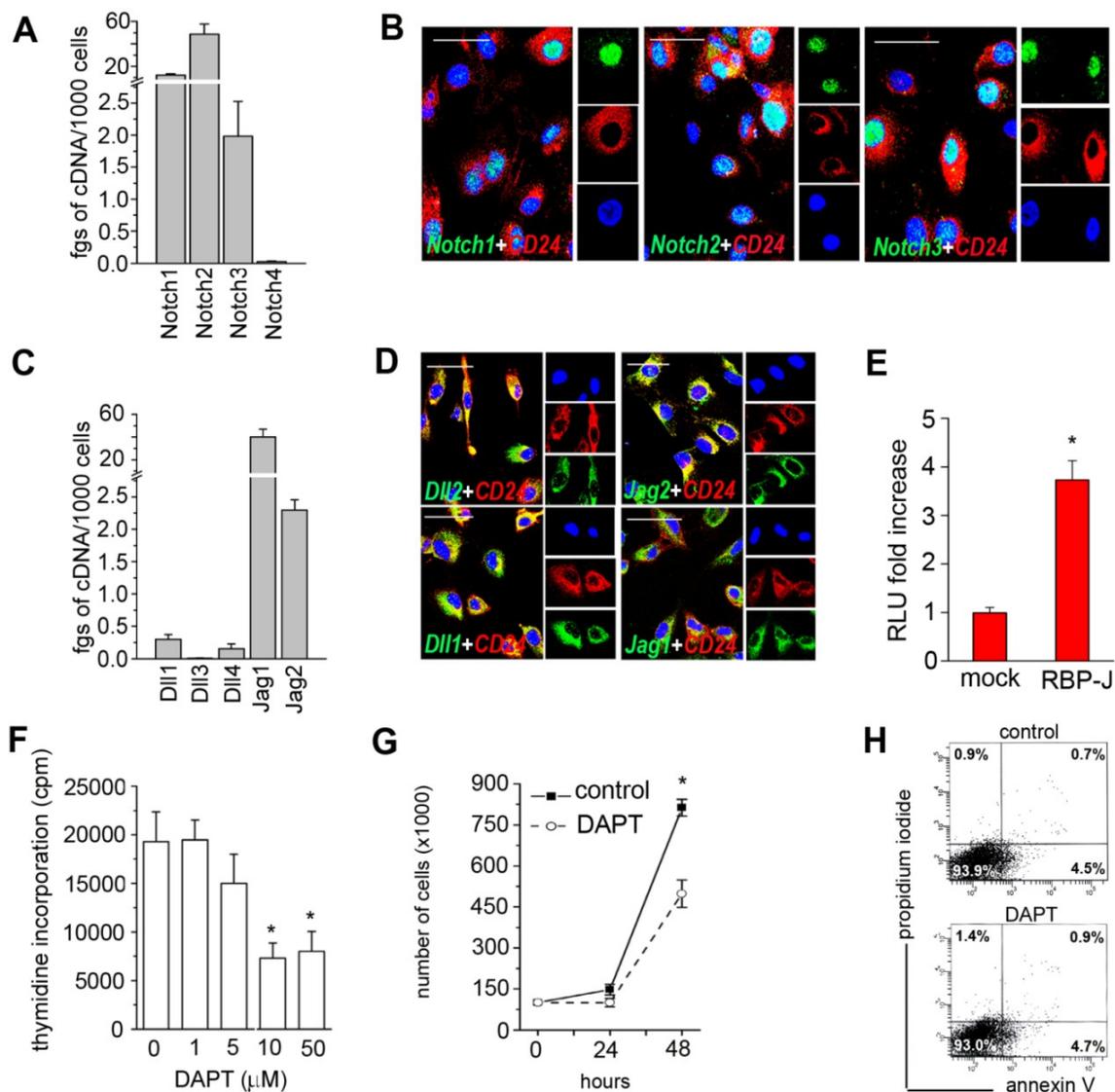


Figura 16. Espressione e proprietà funzionali dei recettori e dei ligandi della pathway di Notch nei progenitori renali umani.

(A) Livelli di mRNA per i recettori Notch valutati con RT-PCR quantitativa real-time su progenitori renali in coltura. I risultati sono espressi come media \pm SEM di esperimenti in triplicato condotti su colture primarie ottenute da cinque diversi donatori. *b* vs. *a*, *c* ed *a* vs. *c*: $P < 0.05$. (B) Immunofluorescenza doppia per Notch1, Notch2 o Notch3 (verde) e CD24 (rosso) in progenitori renali, valutata in microscopia confocale. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. È mostrato un

esperimento rappresentativo di sette esperimenti indipendenti. Barra 50 μm . **(C)** Livelli di mRNA per i ligandi di Notch, valutati con RT-PCR quantitativa real-time su progenitori renali in coltura. I risultati sono espressi come media \pm SEM di esperimenti in triplicato condotti su colture primarie ottenute da cinque diversi donatori. *c vs. a, b, d e d vs. a, b*: $P < 0.05$. **(D)** Immunofluorescenza doppia per Dll1, Dll4, Jag1 o Jag2 (verde) e CD24 (rosso) in progenitori renali, valutata in microscopia confocale. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. È mostrato un esperimento come rappresentativo di sette esperimenti indipendenti. Barra 50 μm . **(E)** Attivazione della *pathway* di Notch nei progenitori renali, valutata tramite infezione con il vettore luciferasi responsivo a RBP-J. I risultati sono stati espressi come media \pm SEM di unità di luciferasi in comparazione ai progenitori renali infettati con il vettore vuoto, ottenute in nove esperimenti indipendenti ($*P < 0.05$). **(F)** Effetto della somministrazione di DAPT (0-50 μM) sulla capacità proliferativa di progenitori renali, valutato mediante incorporazione di $^3\text{[H]}$ -timidina. I risultati rappresentano la media \pm SEM di quattro distinti esperimenti condotti su cellule ottenute da cinque diversi donatori ($*P < 0.05$). **(G)** Curve di crescita che mostrano l'effetto del trattamento con DAPT sul numero di progenitori renali. I risultati sono espressi come media \pm SEM del numero di cellule ottenute in quattro distinti esperimenti condotti su cellule di cinque diversi donatori ($*P < 0.05$). **(H)** Analisi della vitalità di progenitori renali dopo il trattamento con DAPT, valutata al FACS mediante doppia marcatura per annessina V e PI. È mostrato un esperimento rappresentativo di quattro condotti.

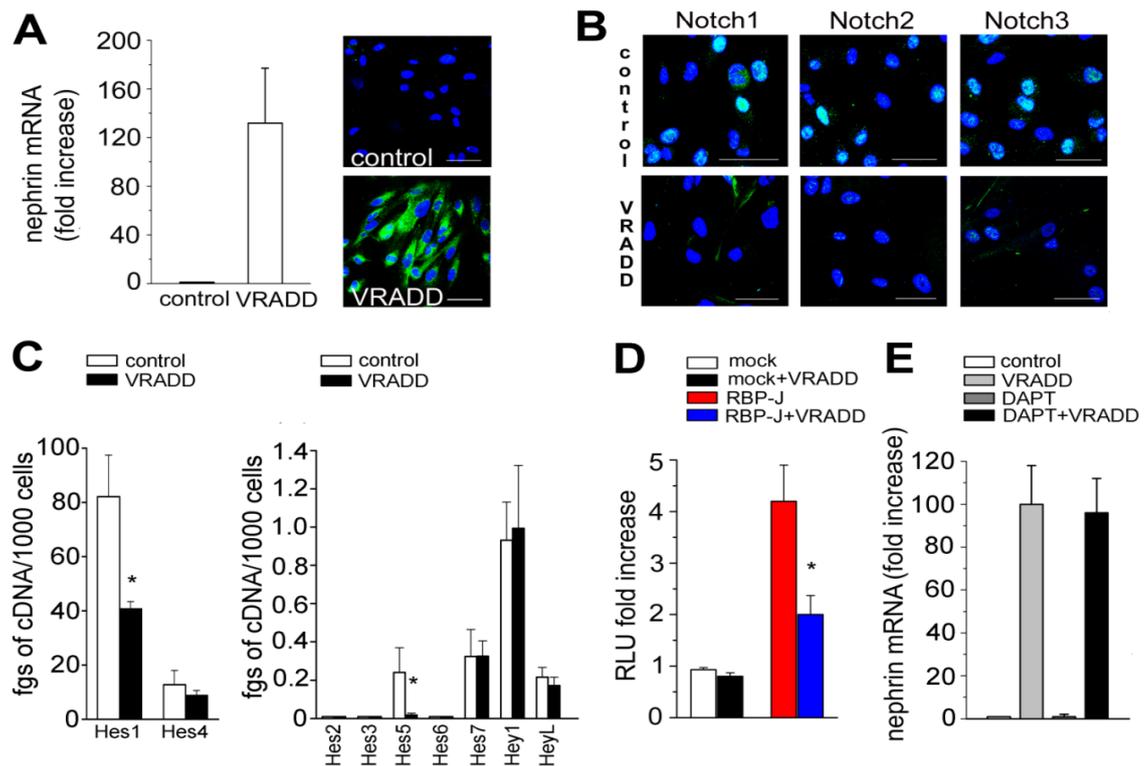


Figura 17. Down-regulation della pathway di Notch durante il differenziamento dei progenitori renali a podociti.

(A) Sinistra: livelli di mRNA per nefrina in progenitori renali prima e dopo la coltura nel medium VRADD, valutati con RT-PCR quantitativa real-time. I risultati sono espressi come media \pm SEM dell'incremento rispetto ai valori basali dei livelli di mRNA per nefrina prima (control) e dopo 48 ore di coltura in VRADD, ottenuti in quattro esperimenti separati. Destra: espressione della proteina nefrina (verde) in progenitori renali, valutata con microscopia confocale prima (in alto) e dopo (in basso) 48 ore di coltura in VRADD. Topro-3 contro-colora il nucleo. È mostrato un esperimento rappresentativo di quattro condotti. Barra 50 μ m. (B) Espressione proteica di Notch1, Notch2 e Notch3 (verde), valutata con microscopia confocale in cellule di controllo (in alto) e dopo 48 ore di coltura in VRADD (in basso). Topro-3 contro-colora il nucleo. È mostrato un esperimento rappresentativo di otto condotti.

Barra 50 μm . **(C)** Livelli di mRNA per i geni target di Notch in progenitori renali prima (control) e dopo 48 ore di coltura in VRADD, valutati con RT-PCR quantitativa real-time. I risultati sono espressi come media \pm SEM dei dati ottenuti in sei esperimenti separati (* $P < 0.05$). **(D)** *Down-regulation* dell'attività della *pathway* di Notch in progenitori renali a seguito del loro differenziamento a podociti, valutata mediante l'infezione con un vettore reporter per l'elemento di risposta trascrizionale RBP-J. I risultati sono espressi come media \pm SEM dei livelli di incremento dell'attività della luciferasi nella popolazione in studio rispetto ai progenitori infettati con il vettore vuoto, ottenuti in otto esperimenti indipendenti (* $P < 0.05$). **(E)** Effetto del trattamento con DAPT sull'incremento dei livelli di mRNA per nefrina in progenitori renali prima (control) e dopo 48 ore di coltura in VRADD. I risultati sono espressi come media \pm SEM dell'incremento del livello basale ottenuto in quattro esperimenti separati.

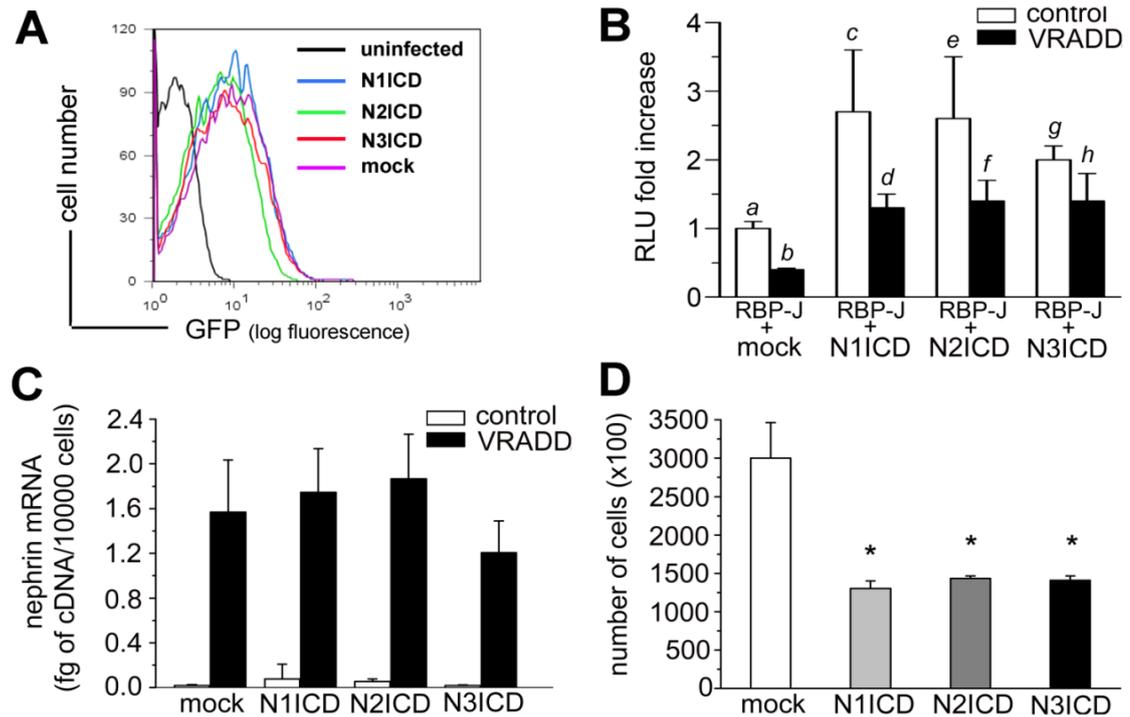


Figura 18. La *down-regulation* di Notch è necessaria per ottenere il differenziamento dei progenitori renali umani a podociti.

(A) Espressione forzata della proteina Notch in progenitori renali come conseguenza dell'infezione con un vettore che determina la contemporanea espressione di N1ICD, N2ICD, o N3ICD e della proteina fluorescente Green fluorescent protein (GFP). Le cellule infettate con il vettore vuoto (mock) esprimono la GFP ma non gli NICD. Sono mostrate cellule non infettate come confronto. È mostrato un esperimento rappresentativo di dieci condotti. (B) La *down-regulation* dell'attività della *pathway* di Notch durante il processo di differenziamento dei progenitori renali a podociti è contrastata dall'infezione con i vettori codificanti per N1ICD, N2ICD o N3ICD, come dimostrato dalla co-infezione con il vettore reporter per l'elemento di risposta trascrizionale RBP-J. I risultati sono espressi come media \pm SEM dei livelli di incremento dell'attività della luciferasi in progenitori renali co-infettati con il vettore

reporter per RBP-J ed il vettore che esprime N1ICD, N2ICD o N3ICD, in confronto alle cellule infettate con il vettore vuoto prima (control) o dopo il loro differenziamento a podociti (VRADD), come ottenuto in almeno quattro esperimenti indipendenti. **b** vs. **a**, **c**, **d**, **e**, **f**, **g**, **h**: $P < 0.05$; **a** vs. **c**, **e**, **g**: $P < 0.05$; **a** vs. **d**, **e** vs. **f**, **e** **g** vs. **h**: *NS*. **(C)** Analisi dell'incremento dei livelli di mRNA per nefrina dopo coltura in VRADD in progenitori renali infettati con il vettore vuoto (mock) e con il vettore che esprime N1ICD, N2ICD o N3ICD. I risultati sono espressi come media \pm SEM dei dati ottenuti in quattro diversi esperimenti. **(D)** Effetti dell'infezione con il vettore vuoto e con quello che esprime N1ICD, N2ICD o N3ICD sul numero di cellule dopo 48 ore di coltura in VRADD. I risultati sono espressi come media \pm SEM di valutazioni in triplicato ottenute da quattro esperimenti separati ($*P < 0.05$).

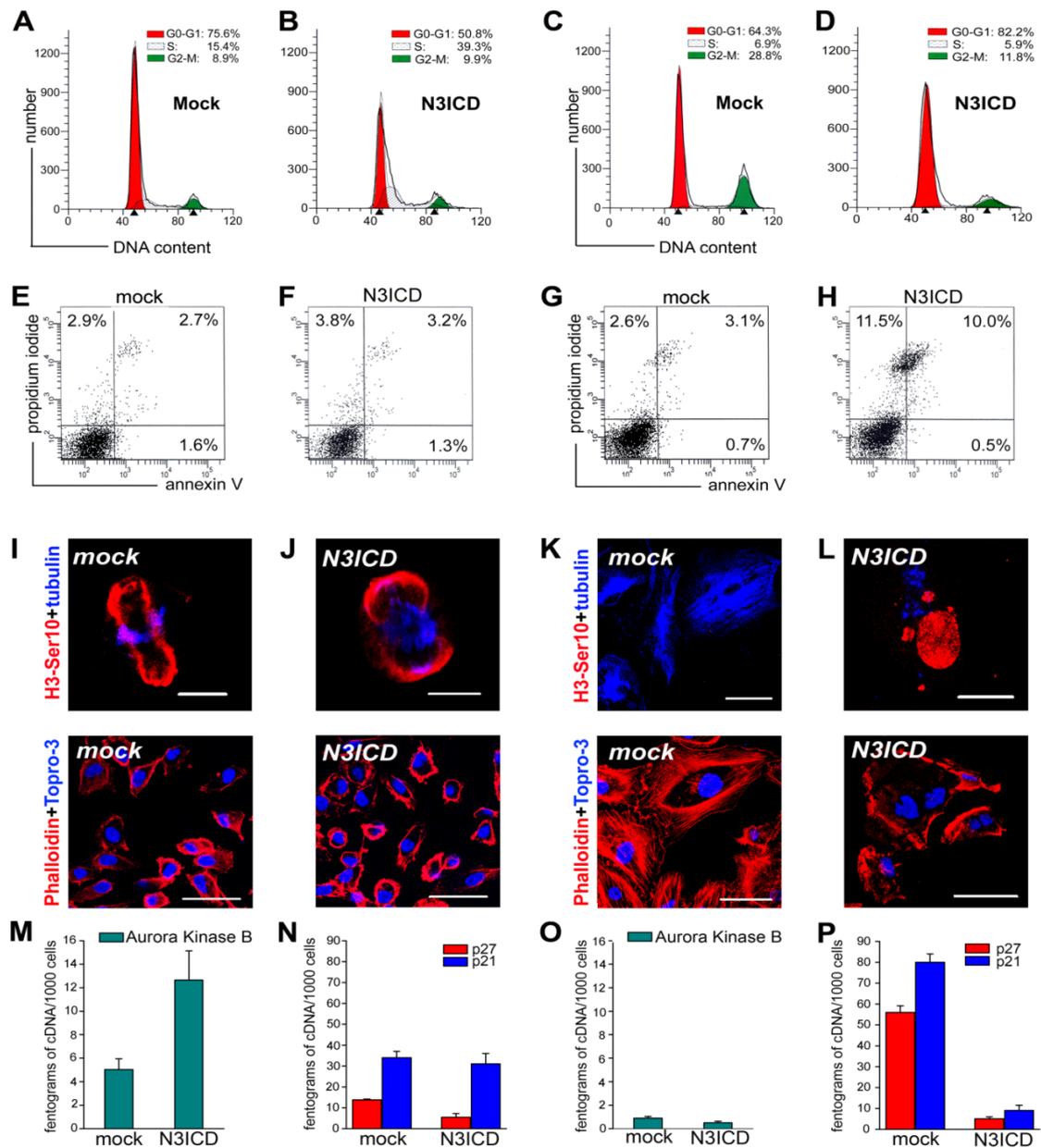


Figura 19. Regolazione della progressione del ciclo cellulare, mitosi, morte cellulare ed organizzazione del citoscheletro in progenitori renali umani infettati con N3ICD prima e dopo il differenziamento a podociti.

(A-B) Analisi del ciclo cellulare effettuata su progenitori infettati con il vettore mock (A) e con il vettore codificante per N3ICD (B). È mostrato un esperimento rappresentativo di quattro condotti. (C-D) Analisi del ciclo cellulare condotta su

progenitori infettati con il vettore mock (C) e con il vettore codificante per N3ICD (D) dopo il differenziamento a podociti. È mostrato un esperimento rappresentativo di quattro condotti. **(E-F)** Analisi FACS della apoptosi/necrosi in progenitori renali infettati con il mock o con il vettore codificante per N3ICD, valutate attraverso lo staining per annessina V e PI. È mostrato un esperimento rappresentativo di quattro condotti. **(G-H)** Analisi FACS della apoptosi/necrosi in progenitori renali infettati con il mock o con il vettore codificante per N3ICD dopo il differenziamento a podociti, valutate attraverso lo staining per annessina V e PI, che rivela un incremento della percentuale di cellule positive per PI/annessina V tra quelle infettate con N3ICD. È mostrato un esperimento rappresentativo di quattro condotti. **(I-J)** In alto: il segnale relativo a H3-Ser10 (rosso) e tubulina (blu) in progenitori renali indifferenziati infettati con mock e con il vettore codificante per N3ICD evidenzia mitosi normali. È mostrata una metafase rappresentativa per le cellule infettate con il mock, mentre per le cellule infettate con il vettore codificante per N3ICD è mostrata una anafase rappresentativa. È illustrato un esperimento rappresentativo di sei condotti. Barra 10 μm . In basso: segnale per falloidina (rosso) in progenitori renali indifferenziati infettati con mock e con il vettore codificante per N3ICD. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. È mostrato un esperimento rappresentativo di sei condotti. Barra 50 μm . **(K-L)** In alto: il segnale relativo a H3-Ser10 (rosso) e tubulina (blu) in progenitori renali infettati con il vettore che esprime N3ICD (L) dopo il loro differenziamento a podociti rivela mitosi aberranti, caratterizzate da micro-/multi-nucleazione (rosso) ed anomala distribuzione del fuso mitotico (blu), in confronto a quanto riscontrato nelle cellule infettate con il vettore vuoto (mock, K). È mostrato un esperimento rappresentativo di sei condotti. Barra 10 μm . In basso: il segnale relativo alla falloidina (rosso) in progenitori renali infettati con il mock (K) e

con il vettore codificante per N3ICD (L) dopo il loro differenziamento a podociti rivela che nei podociti infettati con il mock i filamenti di F-actina sono distribuiti in fasci di tensione lungo l'asse delle cellule, mentre nei podociti infettati con il vettore codificante per N3ICD è presente una redistribuzione delle fibre di F-actina verso la periferia delle cellule. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. È mostrato un esperimento rappresentativo di sei condotti. Barra 50 μm . **(M-N)** Valutazione tramite RT-PCR quantitativa real-time dell'espressione di mRNA per Aurora kinasi B (M), p21^{Cip1/WAF-1} e p27^{Kip1} (N) in progenitori renali indifferenziati infettati con il mock e con il vettore codificante per N3ICD. I risultati sono espressi come media \pm SEM di valutazioni in triplicato condotte in sette esperimenti separati. **(O-P)** Valutazione tramite RT-PCR quantitativa real-time dell'espressione di mRNA per Aurora kinasi B (O), p21^{Cip1/WAF-1} e p27^{Kip1} (P) in progenitori renali dopo il loro differenziamento a podociti. I risultati sono espressi come media \pm SEM di valutazioni in triplicato condotte in sette esperimenti separati.

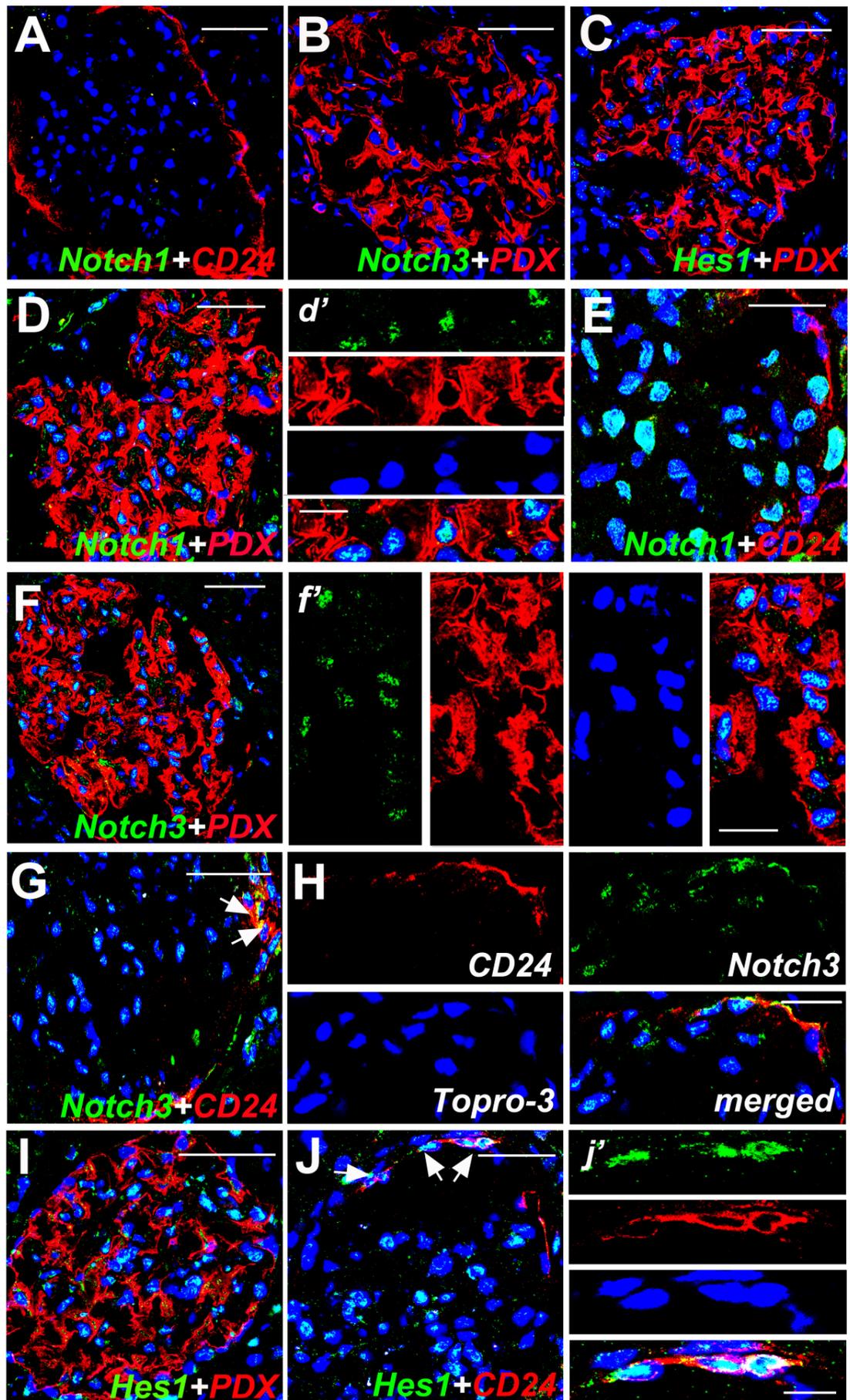


Figura 20. Up-regulation dei componenti della via di segnalazione di Notch in glomeruli di pazienti affetti da nefrite lupica o FSGS.

(A) Immunofluorescenza doppia per Notch1 (verde) e CD24 (rosso) in reni umani adulti sani. Barra 50 μm . (B) Immunofluorescenza doppia per Notch3 (verde) e PDX (rosso) in reni umani adulti sani. Barra 50 μm . (C) Immunofluorescenza doppia per Hes1 (verde) e PDX (rosso) in reni umani adulti sani. Barra 50 μm . (D) Immunofluorescenza doppia per Notch1 (verde) e PDX (rosso) in reni umani adulti di pazienti affetti da nefrite lupica. Barra 50 μm . (d') Alto ingrandimento di cellule Notch1⁺PDX⁺ nel *tuft* glomerulare. Barra 10 μm . (E) Immunofluorescenza doppia per Notch1 (verde) e CD24 (rosso) in un paziente affetto da FSGS. Barra 20 μm . (F) Immunofluorescenza doppia per Notch3 (verde) e PDX (rosso) in un paziente affetto da nefrite lupica. Barra 50 μm . (f') Alto ingrandimento di cellule Notch3⁺PDX⁺ nel *tuft* glomerulare. Barra 20 μm . (G) Immunofluorescenza doppia per Notch3 (verde) e CD24 (rosso) in un paziente affetto da nefrite lupica. Barra 50 μm . (H) Immunofluorescenza doppia per Notch3 (verde) e CD24 (rosso) in un paziente affetto FSGS. Barra 20 μm . (I) Immunofluorescenza doppia per Hes1 (verde) e PDX (rosso) in un paziente affetto da nefrite lupica. Barra 20 μm . (J) Immunofluorescenza doppia per Hes1 (verde) e CD24 (rosso) in un paziente affetto da nefrite lupica. Barra 50 μm . (j') Alto ingrandimento di progenitori renali Hes1⁺CD24⁺. Barra 10 μm . La microscopia confocale è stata eseguita su otto reni umani di soggetti adulti sani e su sezioni biotiche ottenute da quindici pazienti affetti da nefrite lupica e dieci affetti da FSGS. Sono mostrate alcune immagini rappresentative dei risultati ottenuti. Topro-3 contro-colora il nucleo.

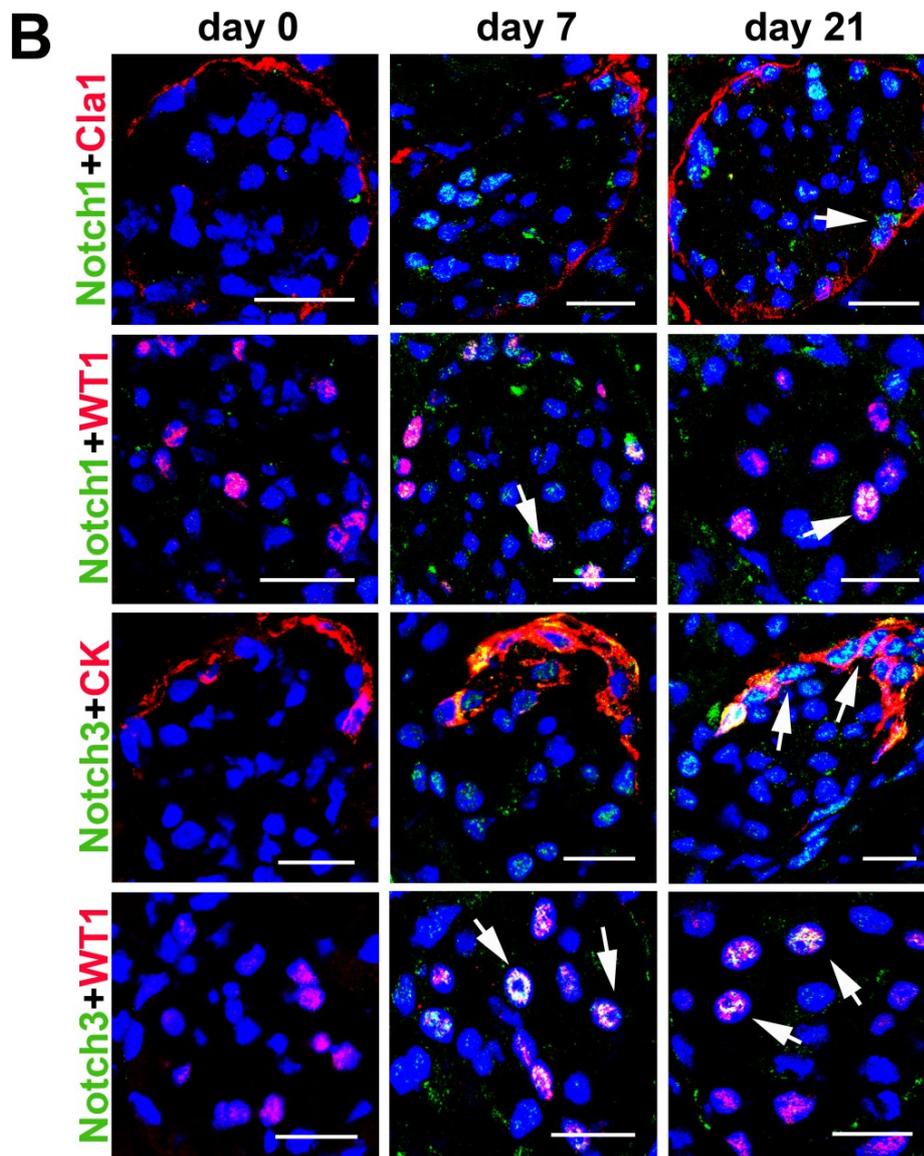
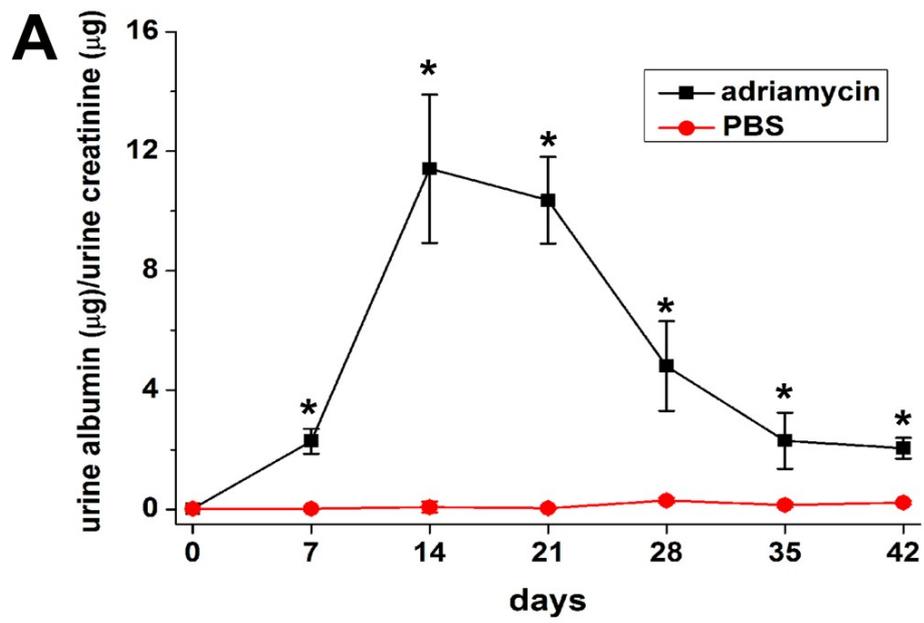


Figura 21. *Up-regulation* dei componenti della via di segnalazione di Notch in podociti e/o progenitori renali di topi SCID affetti da nefropatia da adriamicina.

(A) Valutazione dell'andamento temporale dei valori del rapporto albumina/creatinina urinarie in topi affetti da nefropatia da adriamicina (quadrati neri) in confronto a topi trattati con PBS (cerchi rossi). I dati sono espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti ($n= 12$ topi ad ogni tempo per ogni gruppo di trattamento). $*P<0.05$ **(B)** Immunofluorescenza doppia per Notch1 (verde) e Claudina-1 (Cla1, rosso); Notch1 (verde) e WT1 (rosso); Notch3 (verde) e citocheratina (CK, rosso); Notch3 (verde) e WT1 (rosso) in topi SCID affetti da nefropatia da adriamicina a tempi diversi. Topro-3 contro-colora il nucleo (blu). È mostrato un esperimento rappresentativo dei tre esperimenti indipendenti condotti su un totale di dodici topi. Barra 20 μ m.

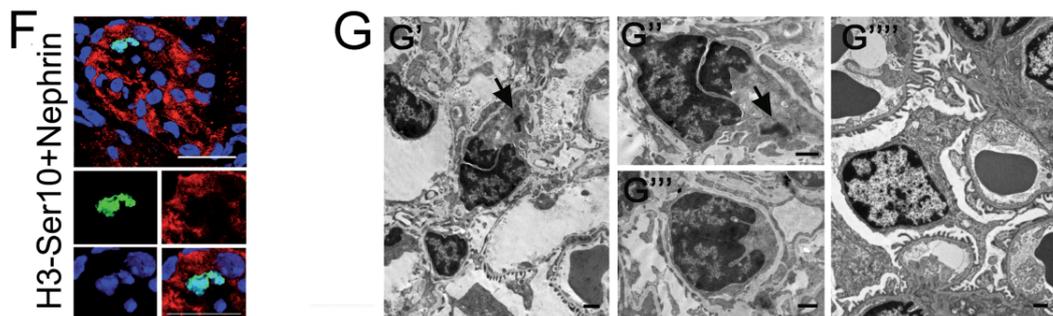
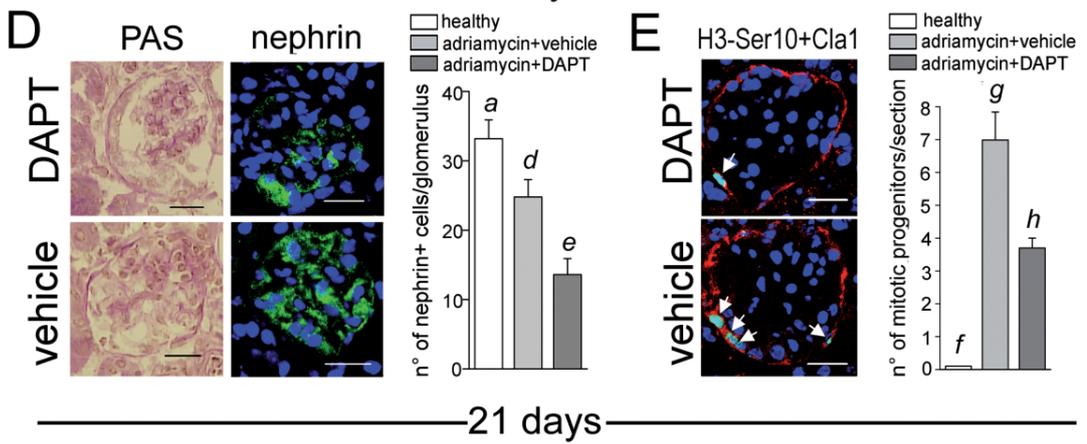
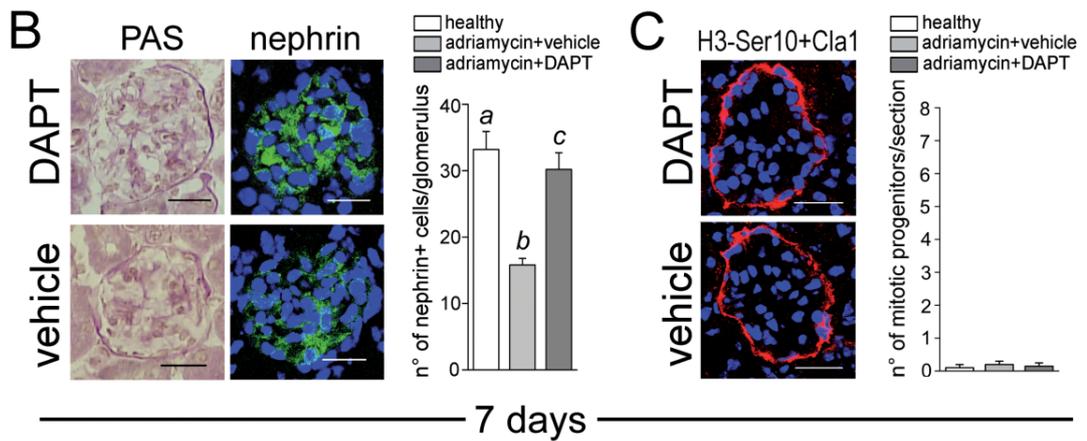
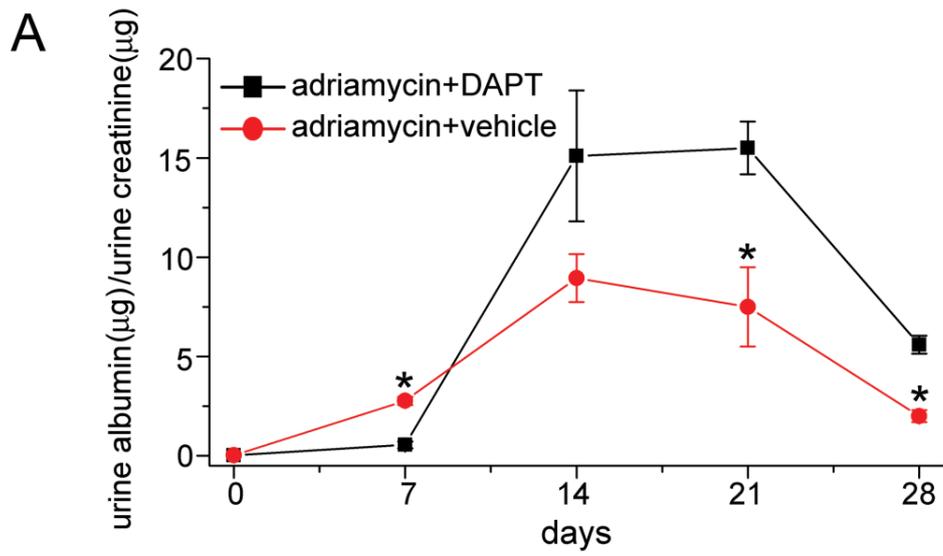


Figura 22. L'inibizione di Notch regola differentemente l'equilibrio tra danno e rigenerazione podocitaria in topi affetti da FSGS.

(A) Valutazione dell'andamento temporale dei valori del rapporto albumina/creatinina urinarie in topi affetti da nefropatia da adriamicina sottoposti al trattamento quotidiano con il veicolo (cerchi rossi) o con DAPT (quadrati neri). I dati sono espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti ($n= 15$ topi ad ogni tempo per ogni gruppo di trattamento). $*P<0.05$. (B) Sinistra: segnale PAS in sezioni renali di topi affetti da nefropatia da adriamicina trattati con veicolo o con DAPT dopo 7 giorni di trattamento. Barra 20 μ m. Centro: il segnale relativo a nefrina (verde) mostra una significativa deplezione di podociti nei topi trattati con il veicolo in confronto a quelli trattati con DAPT. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. Barra 20 μ m. Destra: quantificazione del numero di podociti (cellule positive per la nefrina)/glomerulo. I dati sono espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. *a vs. b, a vs. c, e b vs. c*; $P<0.001$. (C) Sinistra: l'immunofluorescenza doppia per il marker di mitosi H3-Ser10 (verde) e per il marker dei progenitori renali murini Cla1 (rosso) mostra l'assenza di progenitori renali in mitosi dopo 7 giorni dell'applicazione dell'insulto. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. Barra 20 μ m. Destra: quantificazione del numero di progenitori mitotici (cellule H3-Ser10+Cla1+)/sezione. I dati sono espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. (D) Sinistra: segnale PAS in sezioni renali di topi affetti da nefropatia da adriamicina trattati con veicolo o con DAPT dopo 21 giorni di trattamento. Barra 20 μ m. Centro: il segnale relativo a nefrina (verde) mostra un decremento nel numero di podociti nei topi trattati con DAPT in confronto a quelli trattati con il veicolo. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. Barra 20 μ m. Destra: quantificazione del numero di podociti (cellule positive per la nefrina)/glomerulo. I dati sono espressi

come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. *a vs. d, a vs. e, b vs. d, e c vs. e*; $P < 0.001$. **(E)** Sinistra: l'immunofluorescenza doppia per H3-Ser10 (verde) e Cla1 (rosso) mostra un numero di progenitori renali in mitosi significativamente maggiore a 21 giorni dall'insulto nei topi trattati con il veicolo in confronto a quelli che hanno ricevuto il DAPT. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. Barra 20 μ m. Destra: quantificazione del numero di progenitori mitotici (cellule H3-Ser10+Cla1+)/sezione. I dati sono espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. *f vs. g, f vs. h, e g vs. h*; $P < 0.001$. **(F)** Il segnale relativo a H3-Ser10 (verde) e nefrina (rosso) mostra la presenza di podociti mitotici con morfologia nucleare anomala. Topro-3 (blu) contro-colora il nucleo. Barra 20 μ m. È mostrata un'immagine rappresentativa. **(G)** La microscopia elettronica rivela mitosi aberranti **(G')** La micrografia elettronica di podociti glomerulari in un topo affetto da nefropatia da adriamicina mostra nuclei anormali ed un micro-nucleo (freccia), compatibili con il processo della catastrofe mitotica. **(G'')** L'alto ingrandimento di G' evidenzia meglio il micro-nucleo (freccia). **(G''')** Alto ingrandimento di un nucleo etero-cromatico con un peculiare pattern di distribuzione simmetrica della cromatina, suggestivo di una mitosi aberrante. **(G''')** È mostrato un podocita normale per il confronto. Barra 1 μ m. Sono mostrate immagini rappresentative.

4 DISCUSSIONE

I meccanismi molecolari che regolano la proliferazione, così come la determinazione del destino differenziativo verso il *lineage* podocitario nei progenitori renali umani sono attualmente poco conosciuti. In questo lavoro si dimostra il ruolo della via di segnalazione di Notch nella regolazione di entrambi questi processi.

Il primo risultato importante che emerge da questo studio è che l'attivazione del *signaling* di Notch è in grado di indurre l'espansione dei progenitori renali, promuovendo il loro ingresso nella fase S del ciclo cellulare e quindi la divisione mitotica. Questo rappresenta la prima dimostrazione del coinvolgimento di una via di segnalazione nel promuovere le capacità rigenerative delle cellule progenitrici renali. Al contrario, un'attenuazione dell'attività di Notch è stata osservata durante il *commitment* dei progenitori verso il destino differenziativo podocitario. Tuttavia, la *down-regulation* di Notch non è né sufficiente né necessaria per l'acquisizione del fenotipo maturo; ciò nonostante, la compromissione dell'attenuazione del *signaling*, che normalmente accompagna il differenziamento dei progenitori a podociti, conduce alla loro morte. Il processo di differenziamento, infatti, si è dimostrato associato all'arresto nella fase G2/M del ciclo cellulare ed all'attivazione dello specifico *checkpoint*, riflettendo in tal modo la presenza nei podociti maturi di una barriera intrinseca alla replicazione. L'attivazione persistente della via di segnalazione di Notch induce i podociti ad oltrepassare il *checkpoint* G2/M, determinando di conseguenza la distruzione del citoscheletro e la morte cellulare.

Il ruolo centrale del podocita nella determinazione della sclerosi glomerulare è stato stabilito da tempo (14) (5) (1) (15) (10). Tuttavia, i meccanismi responsabili per la perdita dei podociti in risposta ad un danno sono ancora oggi largamente sconosciuti. A tal proposito sono state avanzate diverse ipotesi. Alcuni autori hanno suggerito che la deplezione numerica e funzionale dei podociti possa essere imputata alla loro morte per apoptosi o al loro distacco dalle strutture glomerulari di cui sono costituenti fondamentali; tuttavia la mancata osservazione di podociti apoptotici in molti disordini glomerulari noti conduce ad ipotizzare che debbano essere coinvolti meccanismi di morte cellulare alternativi (10) (323) (13) (324).

In questo studio è stata fornita la prima evidenza che il podocita può morire attraverso un meccanismo noto come “catastrofe mitotica” in seguito all’attivazione di Notch. La catastrofe mitotica è una modalità di morte cellulare che si verifica durante, o subito dopo, una mitosi non regolata o fallita, perciò definita aberrante, in quanto non porta a segregazione cromosomica e divisione cellulare, bensì alla formazione di cellule non vitali, voluminose, contenenti molti nuclei e frammenti di cromosomi; può essere accompagnata da alterazioni morfologiche che includono la micro/multi-nucleazione, che rappresenta l’unico elemento che consente di distinguere la catastrofe mitotica sia dalla apoptosi che dalla necrosi (325) (326). È comunque opportuno precisare che catastrofe mitotica ed apoptosi non sono fenomeni mutuamente esclusivi, tanto che la catastrofe mitotica è spesso seguita da apoptosi in cellule che dispongono dei meccanismi genetici e molecolari necessari per attuarla (327) (328) (329).

Nonostante la catastrofe mitotica non fosse stata descritta in precedenza come un meccanismo di morte podocitaria, esistono alcuni dati che suggeriscono la possibilità che nei disordini glomerulari il podocita vada incontro a tale processo. Infatti la

presenza di podociti multinucleati è stata riportata come dato non specifico in numerosi lavori sperimentali (330) (331) (332) (333), così come in alcune glomerulopatie umane (334) (335) (336) (337).

I risultati del presente studio suggeriscono inoltre che il podocita sia in grado di iniziare la sintesi del DNA, ma che non possa sostenere il processo di citodieresi e quindi completare la mitosi. Infatti la divisione cellulare appare possibile soltanto per i progenitori renali, che mostrano una morfologia cuboidale/piatta ed un'organizzazione architetturale del citoscheletro che consente loro la progressione attraverso le diverse fasi della divisione mitotica, e quindi la proliferazione. Non appena i progenitori renali iniziano il differenziamento ed acquisiscono l'aspetto morfologico *octopus-like* (tentacolare) caratteristico dei podociti maturi perdono la capacità di moltiplicarsi. Infatti immediatamente a seguito dell'ingresso nel ciclo cellulare, i podociti vanno incontro alla distruzione dell'organizzazione specificamente strutturata del citoscheletro (338) (339) (340), ivi compreso il sistema dell'actina, che è essenziale per mantenere l'integrità e la permeabilità selettiva di tali cellule.

Il differenziamento dei progenitori renali a podociti è caratterizzato inoltre da un incremento dell'espressione degli inibitori del ciclo cellulare p21^{Cip1/WAF-1} e p27^{Kip1}, che contrastano la capacità delle cellule mature di progredire attraverso il ciclo cellulare. La *down-regulation* di p21^{Cip1/WAF-1} e p27^{Kip1} indotta dall'attivazione di Notch, infatti, forza la progressione verso la divisione mitotica di una cellula, il podocita maturo, che non è in grado di assemblare un fuso mitotico efficiente a causa della scarsa espressione di Aurora kinasi B, che è essenziale per questo obiettivo e quindi, in definitiva, per la citodieresi.

Considerati nel complesso questi dati suggeriscono che l'ingresso in mitosi rappresenti per il podocita terminalmente differenziato un evento *trigger* per la morte cellulare, fornendo in tal modo anche una spiegazione dell'impossibilità, riscontrata nella maggior parte delle malattie glomerulari croniche causa di ESRD, di sostituire, attraverso la divisione cellulare di elementi adiacenti, i podociti danneggiati o persi a seguito dell'applicazione di un insulto al glomerulo.

Tuttavia, anche disordini glomerulari caratterizzati da un danno podocitario esteso possono andare incontro a regressione e remissione, suggerendo che la perdita di podociti possa in qualche modo, comunque, essere recuperata (3) (341). La scoperta dei progenitori renali (20), così come della loro capacità di rigenerare nuovi podociti in seguito ad un danno inferto al glomerulo (22) (150), sono in accordo con l'osservazione fornita in questo studio che l'*outcome* dei disordini glomerulari dipende, in definitiva, dall'equilibrio che si instaura tra danno podocitario e rigenerazione fornita dai progenitori renali.

Questi risultati sollevano però alcuni interrogativi aggiuntivi. Ad esempio, quale potrebbe essere lo stimolo che induce l'attivazione di Notch nei podociti e/o nei progenitori? Studi precedenti hanno dimostrato che TGF- β (342) (343), che è rilasciato in seguito al danno podocitario o all'esposizione alla proteinuria (344), è un potente attivatore della via di segnalazione di Notch, suggerendo che l'attivazione di questa *pathway* possa rappresentare una risposta adattativa del glomerulo agli insulti inferti alle cellule podocitarie.

Le valutazioni condotte su sezioni di tessuto renale di pazienti affetti da malattie glomerulari croniche imputabili ad un danno podocitario hanno evidenziato una consistente maggior espressione dei costituenti della via di segnalazione di Notch sia nei podociti che nelle cellule progenitrici rispetto a quella rilevabile in reni di

soggetti adulti sani, consentendo di ipotizzare che questo possa rappresentare un meccanismo coinvolto, a vari livelli, nella patogenesi del danno.

Nonostante gli effetti biologici dei diversi recettori di Notch sembrino simili, è stata rinvenuta una differente espressione delle diverse sottoclassi recettoriali nei progenitori renali di pazienti affetti da glomerulopatie croniche proteinuriche, quali la nefrite lupica o la FSGS; in particolare, Notch3 rappresentava il recettore con espressione più elevata nei progenitori renali. Questi risultati suggeriscono che una modulazione del danno e della rigenerazione potrebbe verificarsi attraverso la segnalazione promossa da sottotipi recettoriali diversi. Indubbiamente, comunque, sono necessari studi più numerosi e approfonditi per chiarire questo punto.

Infine, l'inibizione della *pathway* di Notch in un modello murino di FSGS ha determinato conseguenze differenti nelle due diverse fasi, acuta e cronica, del danno renale: infatti, mentre nelle fasi immediatamente successive all'insulto glomerulare era in grado di migliorare la morfologia e la funzione renale, successivamente si è dimostrata responsabile di un significativo peggioramento della proteinuria e del danno rilevabile istologicamente. Alla luce dei risultati ottenuti, questo risulta imputabile al coinvolgimento, nelle diverse fasi del processo, delle due popolazioni, quella dei podociti e delle cellule progenitrici, rispettivamente: mentre quindi nelle fasi iniziali l'inibizione di Notch è in grado di prevenire il complesso di eventi che culmina con la morte cellulare dei podociti per catastrofe mitotica, nelle successive fasi del processo contrasta il potenziale rigenerativo dei progenitori renali.

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno fornito la spiegazione per le osservazioni di due precedenti studi, che hanno utilizzato modelli sperimentali di topi transgenici per ottenere un'attivazione specifica del *signaling* di Notch nella popolazione podocitaria: in entrambi i casi, l'over-espressione di N1ICD determinava

l'insorgenza di un danno glomerulare cronico caratterizzato da albuminuria (343) (345). Tuttavia, mentre in uno studio l'espressione attiva e forzata di Notch1 induceva un incremento della morte podocitaria per apoptosi (343), nell'altro il medesimo evento era associato all'induzione della proliferazione di cellule con un fenotipo immaturo, ossia le cellule progenitrici renali, nell'ambito del glomerulo (345). I risultati del nostro lavoro consentono di riconciliare queste osservazioni apparentemente contrastanti. Infatti i due studi differiscono per il *timing* di attivazione dell'espressione di Notch1, con la conseguenza che nello studio di Niranjana *et al.* l'*up-regulation* di Notch è selettivamente ottenuta nei podociti maturi (si tratta infatti di un modello di topo transgenico inducibile tramite la somministrazione di doxiciolina, che viene eseguita a partire dalle quattro settimane di età), mentre nel lavoro di Waters *et al.* è costitutiva e pertanto riscontrabile anche nella popolazione dei progenitori renali. La considerazione complessiva di questa mole di dati suggerisce quindi che l'espressione attiva di Notch induce la morte in podociti maturi, mentre è in grado di indurre la proliferazione se attivata prima del loro pieno differenziamento (346), ovvero nelle cellule progenitrici. Quest'ultima considerazione, confermata anche dai risultati del presente studio, consente di sostenere che nel lavoro di Waters *et al.* (345) il danno podocitario, indotto dall'attivazione di Notch nei podociti differenziati, sia stato almeno parzialmente compensato dall'attivazione della medesima via di segnalazione anche nei progenitori, spiegando in tal modo il riscontro di una proteinuria più lieve e di una perdita di funzionalità renale meno grave rispetto allo studio di Niranjana *et al.* (343).

Considerati nel complesso, questi dati forniscono la prima dimostrazione che la gravità delle malattie glomerulari dipende dall'equilibrio, regolato dalla *pathway* di Notch, tra grado di danno e morte podocitari ed entità della rigenerazione glomerulare fornita dalle cellule progenitrici renali, aprendo pertanto alla possibilità, in precedenza del tutto non contemplabile, che in pazienti affetti da malattie glomerulari tale equilibrio possa essere opportunamente manipolato per innescare o potenziare i processi che conducono alla rigenerazione podocitaria e con questa, alla remissione clinica ed alla regressione del danno renale.

BIBLIOGRAFIA

1. **Szczech LA, Lazar IL.** Projecting the United States ESRD population: issues regarding treatment of patients with ESRD. *Kidney Int Suppl.* 2004, Vol. (90), S3-7.
2. **Little MH.** Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2006, Vol. 17(9), 2390-401.
3. **Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A.** Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest.* 2006, Vol. 116(2), 288-96.
4. **Olson JL, Heptinstall RH.** Nonimmunologic mechanisms of glomerular injury. *Lab Invest.* 1988, Vol. 59(5), 564-78.
5. **Wiggins RC.** The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 2007, Vol. 71(12), 1205-14.
6. **Fogo AB.** Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2007, Vol. 22, 2011-22.
7. **Kriz W, LeHir M.** Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases- insights from animal models. *Kidney Int.* 2005, Vol. 67(2), 404-19.
8. **Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, Saunders TL, Dysko RC, Kohno K, Holzman LB, Wiggins RC.** Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol.* 2005, Vol. 16(10), 2941-52.
9. **Lasagni L, Romagnani P.** Glomerular Epithelial Stem Cells: The Good, The Bad, and The Ugly. *J Am Soc Nephrol.* 2010, Vol. 21, 1612-19.
10. **Mundel P, Shankland SJ.** Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002, Vol. 13(12), 3005-15.
11. **Kretzler M.** Role of podocytes in focal sclerosis: defining the point of no return. *J Am Soc Nephrol.* 2005, Vol. 16(10), 2830-2.
12. **Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, Kershaw D, Wiggins R.** Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int.* 2001, Vol. 60(3), 957-68.
13. **Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Böttinger EP.** Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest.* 2001, Vol. 108(6), 807-16.
14. **Kwoh C, Shannon MB, Miner JH, Shaw A.** Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu Rev Pathol.* 2006, Vol. 1, 349-74.
15. **Kriz W, Lemley KV.** The role of the podocyte in glomerulosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1999, Vol. 8(4), 489-97.
16. **Macconi D, Sangalli F, Bonomelli M, Conti S, Condorelli L, Gagliardini E, Remuzzi G, Remuzzi A.** Podocyte repopulation contributes to regression of glomerular injury induced by ACE inhibition. *Am J Pathol.* 2009, Vol. 174(3), 797-807.

17. **Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M.** Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med.* 1998, Vol. 339(2), 69-75.
18. **Gagliardini E, Corna D, Zoja C, Sangalli F, Carrara F, Rossi M, Conti S, Rottoli D, Longaretti L, Remuzzi A, Remuzzi G, Benigni A.** Unlike each drug alone, lisinopril if combined with avosentan promotes regression of renal lesions in experimental diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009, Vol. 297(5), F1448-56.
19. **Ruggenenti P, Perna A, Benini R, Bertani T, Zoccali C, Maggiore Q, Salvadori M, Remuzzi G.** In chronic nephropathies prolonged ACE inhibition can induce remission: dynamics of time-dependent changes in GFR. Investigators of the GISEN Group. Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Nefrologia. *J Am Soc Nephrol.* 1999, Vol. 10(5), 997-1006.
20. **Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P.** Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006, Vol. 17(9), 2443-56.
21. **Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, Parente E, Mancina R, Netti GS, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Gesualdo L, Rotondi M, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P.** Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med.* Vol. 205(2), 479-90.
22. **Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, Parente E, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Maggi E, Serio M, Vannelli GB, Lasagni L, Romagnani S, Romagnani P.** Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol.* 2009, Vol. 20(2), 322-32.
23. **Romagnani P.** From Proteus to Prometheus: learning from fish to modulate regeneration. *J Am Soc Nephrol.* 2010, Vol. 21(5), 726-8.
24. **Smeets B, Angelotti ML, Rizzo P, Dijkman H, Lazzeri E, Mooren F, Ballerini L, Parente E, Sagrinati C, Mazzinghi B, Ronconi E, Becherucci F, Benigni A, Steenbergen E, Lasagni L, Remuzzi G, Wetzels J, Romagnani P.** Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2009, Vol. 20(12), 2593-603.
25. **Blanpain C, Horsley V, Fuchs E.** Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell.* 2007, Vol. 128(3), 445-58.
26. **Fortini ME.** Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell.* 2009, Vol. 16(5), 633-47.
27. **Campa VM, Gutiérrez-Lanza R, Cerignoli F, Díaz-Trelles R, Nelson B, Tsuji T, Barcova M, Jiang W, Mercola M.** Notch activates cell cycle reentry and progression in quiescent cardiomyocytes. *J Cell Biol.* 2008, Vol. 183(1), 129-41.
28. **Mizutani K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Gaiano N.** Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature.* 2007, Vol. 449(7160), 351-5.
29. **Carlson ME, Hsu M, Conboy IM.** Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature.* 2008, Vol. 454(7203), 528-32.
30. **Rosenthal N.** Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med.* 2003, Vol. 349(3), 267-74.
31. **Alison MR, Islam S.** Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009, Vol. 217(2), 144-60.

32. **Weissman IL, Anderson DJ, Gage F.** Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001, Vol. 17, 387-403.
33. **Zhou Q, Melton DA.** Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell.* 2008, Vol. 3(4), 382-8.
34. **Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA.** An introduction to stem cells. *J Pathol.* 2002, Vol. 197(4), 419-23.
35. **Melton DA, Cowan C.** Stemness: Definitions, Criteria, and Standards. *Handbook of Stem Cells.* s.l. : [editor Lanza, R.]; Vol 2, XXI-XXVIII, 2004.
36. **He S, Nakada D, Morrison SJ.** Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009, Vol. 25, 377-406.
37. **Papaioannou V.** Stem cells and Differentiation. *Differentiation.* 2001, Vol. 68(4-5), 153-4.
38. **Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ.** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008, Vol. 451(7175), 141-6.
39. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007, Vol. 131(5), 861-72.
40. **Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR.** A stem cell molecular signature. *Science.* 2002, Vol. 298(5593), 601-4.
41. **Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA.** "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002, Vol. 298(5593), 597-600.
42. **Zhang L, Rayner S, Katoku-Kikyo N, Romanova L, Kikyo N.** Successful co-immunoprecipitation of Oct4 and Nanog using cross-linking. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, Vol. 361(3), 611-4.
43. **Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H.** Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007, Vol. 9(6), 625-35.
44. **Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH.** The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2006, Vol. 38(4), 431-40.
45. **Mizrak D, Brittan M, Alison MR.** CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008, Vol. 214(1), 3-9.
46. **Morrison SJ, Spradling AC.** Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008, Vol. 132(4), 598-611.
47. **Smith AG.** Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001, Vol. 17, 435-62.
48. **Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC.** Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, Vol. 90(18), 8424-8.
49. **Nagy A, Gócza E, Diaz EM, Prideaux VR, Iványi E, Markkula M, Rossant J.** Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development.* 1990, Vol. 110(3), 815-21.

50. **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998, Vol. 282(5391), 1145-7.
51. **Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H.** Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*. 1998, Vol. 125(9), 1747-57.
52. **Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP.** Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, Vol. 92(17), 7844-8.
53. **Jeanisch R, Young R.** Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 1998, Vol. 132(4), 567-82.
54. **Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J.** Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 1998, Vol. 282(5396), 2072-5.
55. **Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL.** Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 1992, Vol. 70(5), 841-7.
56. **Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ.** Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 1992, Vol. 359(6395), 482-3.
57. **Verfaillie CM.** Adult stem cells: Tissue specific or not? *Handbook of Stem Cells*. s.l. : [editor Lanza, R.]; Vol 2, 13-17, 2004.
58. **Lanza RP.** *Essential of stem cell biology*. s.l. : Academic Press, 2006.
59. **Rizvi AZ, Wong MH.** Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells*. 2005, Vol. 23(2), 150-65.
60. **Anglani F, Forino M, Del Prete D, Tosetto E, Torregrossa R, D'Angelo A.** In search of adult renal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2004, Vol. 8(4), 474-87.
61. **Till JE, McCulloch EA.** A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. *Rad Res*. 1961, Vol. 14, 213-22.
62. **Pillow RP, Epstein RB, Buckner CD, Giblett ER, Thomas ED.** Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion. *N Engl J Med*. 1966, Vol. 275(2), 94-7.
63. **Spain LM, Mulligan RC.** Purification and characterization of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, Vol. 89(9), 3790-4.
64. **Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM.** Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1989, Vol. 74(6), 1905-14.
65. **Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE.** Characterization of cord blood hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003, Vol. 996, 67-71.
66. **Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ.** Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp Hematol*. 1999, Vol. 27(9), 1418-27.
67. **Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC.** Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996, Vol. 183(4), 1797-806.
68. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, Vol. 284(5411), 143-7.

69. **Owen M.** Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. [aut. libro] Peck WA. *Bone and mineral research*. New York : Elsevier, vol 3, 1-25, 1985.
70. **Friedenstein AJ.** Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus*. 1980, Vol. 25, 19-29.
71. **Aubin JE.** Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl*. 1998, Vol. 30-31, 73-82.
72. **Deans RJ, Moseley AB.** Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000, Vol. 28(8), 875-84.
73. **Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL.** Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1996, Vol. 11(3), 312-24.
74. **Dexter TM.** Stromal cell associated haematopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*. 1982, Vol. 1, 87-94.
75. **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002, Vol. 418(6893), 41-9.
76. **Hristov M, Erl W, Weber PC.** Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003, Vol. 23(7), 1185-9.
77. **Asahara T, Kawamoto A.** Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004, Vol. 287(3), C572-9.
78. **Dignat-George F, Sampol J.** Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol*. 2000, Vol. 65(4), 215-20.
79. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997, Vol. 275(5302), 964-7.
80. **Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S.** Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000, Vol. 95(3), 952-8.
81. **Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W.** In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000, Vol. 95(10), 3106-12.
82. **Flamme I, Risau W.** Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992, Vol. 116(2), 435-9.
83. **Weiss MJ, Orkin SH.** In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest*. 1996, Vol. 97(3), 591-5.
84. **Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF.** VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000, Vol. 70(3), 829-34.
85. **Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravelleaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T.** Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000, Vol. 86(12), 1198-202.
86. **Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL.** Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*. 2001, Vol. 115(1), 186-94.

87. **Potten CS, Loeffler M.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990, Vol. 110(4), 1001-20.
88. **Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL.** Neural stem cells: an overview. *Circ Res*. 2003, Vol. 92(6), 598-608.
89. **Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A.** Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004, Vol. 427(6976), 740-4.
90. **Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U, Frisén J.** Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000, Vol. 288(5471), 1660-3.
91. **Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF.** Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*. 2001, Vol. 412(6848), 736-9.
92. **Mokry J, Karbanova J, Filip S.** Differentiation potential of murine neural stem cells in vitro and after transplantation. *Transplant Proc*. 2005, Vol. 37(1), 268-72.
93. **Shih CC, Weng Y, Mamelak A, LeBon T, Hu MC, Forman SJ.** Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood*. 2001, Vol. 98(8), 2412-22.
94. **Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL.** Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2000, Vol. 3(10), 986-91.
95. **Goldring K, Partridge T, Watt D.** Muscle stem cells. *J Pathol*. 2002, Vol. 197(4), 457-67.
96. **Sabourin LA, Rudnicki MA.** The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*. 2000, Vol. 57(1), 16-25.
97. **Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z.** Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J Cell Sci*. 2004, Vol. 117(Pt 22), 5393-404.
98. **Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, Dimaio JM, Gallardo TD, Garry DJ.** Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells*. 2004, Vol. 22(7), 1305-20.
99. **Sell S.** Electron microscopic identification of putative liver stem cells and intermediate hepatocytes following periportal necrosis induced in rats by allyl alcohol. *Stem Cells*. 1997, Vol. 15(5), 378-85.
100. **Boquest AC, Shadadfar A, Brinchmann JE, Collas P.** Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods Mol Biol*. 2006, Vol. 325, 35-46.
101. **Heath JP.** Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int*. 1996, Vol. 20(2), 139-46.
102. **Alonso L, Fuchs E.** Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, Vol. 100, 11830-5.
103. **Barile L, Messina E, Giacomello A, Marbàn E.** Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007, Vol. 50, 31-48.
104. **Leri A, Kajstura J, Anversa P, Frishman WH.** Myocardial regeneration and stem cell repair. *Curr Probl Cardiol*. 2008, Vol. 33(3), 91-153.
105. **Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, Robbins J, Lee RT.** Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells

refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.* 2007, Vol. 13(8), 970-4.

106. **Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A.** Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res.* 2004, Vol. 95(9), 911-21.

107. **Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P.** Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, Vol. 104(35), 14068-73.

108. **Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y.** Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature.* 2008, Vol. 456(7219), 250-4.

109. **Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ.** Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells.* 2004, Vol. 22(3), 355-66.

110. **Boulton M, Albon J.** Stem cells in the eye. *Int J Biochem Cell Bio.* 2004, Vol. 36(4), 643-57.

111. **Coles BL, Horsford DJ, McInnes RR, van der Kooy D.** Loss of retinal progenitor cells leads to an increase in the retinal stem cell population in vivo. *Eur J Neurosci.* 2006, Vol. 23(1), 75-82.

112. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998, Vol. 279(5356), 1528-30.

113. **Wagers AJ, Weissman IL.** Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004, Vol. 116(5), 639-48.

114. **Wulf GG, Jackson KA, Goodell MA.** Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol.* 2001, Vol. 29(12), 1361-70.

115. **Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT.** Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008, Vol. 453(7193), 314-21.

116. **Dressler GR.** The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006, Vol. 22, 509-29.

117. **Romagnani P.** Toward the identification of a "renopoietic system"? *Stem Cells.* 2009, Vol. 27(9), 2247-53.

118. **Imai E, Iwatani H.** The continuing story of renal repair with stem cells. *J Am Soc Nephrol.* 2007, Vol. 18(9), 2423-4.

119. **Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q.** The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* 2004, Vol. 114(6), 795-804.

120. **Dekel B, Zangi L, Shezen E, Reich-Zeliger S, Eventov-Friedman S, Katchman H, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Margalit R, Reisner Y.** Isolation and characterization of nontubular sca-1⁺lin⁻ multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2006, Vol. 17(12), 3300-14.

121. **Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Derigibus MC, Cantino D, Camussi G.** Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol.* 2005, Vol. 166(2), 545-55.

122. **Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME.** Isolation

- and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol*. 2006, Vol. 17(11), 3028-40.
123. **Challen GA, Bertocello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH.** Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity. *J Am Soc Nephrol*. 2006, Vol. 17(7), 1896-912.
124. **Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y.** Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2003, Vol. 14(12), 3138-46.
125. **Cantley LG.** Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2005, Vol. 1(1), 22-32.
126. **Vogetseder A, Karadeniz A, Kaissling B, Le Hir M.** Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. *Histochem Cell Biol*. 2005, Vol. 124(2), 97-104.
127. **Kiel MJ, He S, Ashkenazi R, Gentry SN, Teta M, Kushner JA, Jackson TL, Morrison SJ.** Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature*. 2007, Vol. 449(7159), 238-42.
128. **Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, McMahon AP, Bonventre JV.** Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*. 2008, Vol. 2(3), 284-91.
129. **Oliver JA, Klinakis A, Cheema FH, Friedlander J, Sampogna RV, Martens TP, Liu C, Efstratiadis A, Al-Awqati Q.** Proliferation and migration of label-retaining cells of the kidney papilla. *J Am Soc Nephrol*. 2009, Vol. 20(11), 2315-27.
130. **Adams DC, Oxburgh L.** The long-term label retaining population of the renal papilla arises through divergent regional growth of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009, Vol. 297(3), F809-15.
131. **Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV.** Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*. 2005, Vol. 115(7), 1743-55.
132. **Lin F, Moran A, Igarashi P.** Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest*. 2005, Vol. 115(7), 1756-64.
133. **Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM.** Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, Vol. 100(Suppl 1), 11854-60.
134. **Cho KJ, Trzaska KA, Greco SJ, McArdle J, Wang FS, Ye JH, Rameshwar P.** Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells*. 2005, Vol. 23(3), 383-91.
135. **Finckh ES, Joske RA.** The occurrence of columnar epithelium in Bowman's capsule. *J Pathol Bacteriol*. 1954, Vol. 68(2), 646-8.
136. **Nachman RL.** Metaplasia of parietal capsular epithelium of renal glomerulus. Report of an autopsied case of carcinoma of the liver. *Arch Pathol*. 1962, Vol. 73, 48-52.
137. **Kanel GC, Peters RL.** Glomerular tubular reflux--a morphologic renal lesion associated with the hepatorenal syndrome. *Hepatology*. 1984, Vol. 4(2), 242-6.
138. **Valdes AJ, Zhang JM.** Intraglomerular tubular epithelial cells. A marker of glomerular hematuria. *Arch Pathol Lab Med*. 1987, Vol. 111(2), 189-91.
139. **Andrews PM.** The presence of proximal tubulelike cells in the kidney parietal epithelium in response to unilateral nephrectomy. *Anat Rec*. 1981, Vol. 200(1), 61-5.

140. **Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, Cotsarelis G.** Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med.* 2005, Vol. 11(12), 1351-4.
141. **Levy V, Lindon C, Harfe BD, Morgan BA.** Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell.* 2005, Vol. 9(6), 855-61.
142. **Liu KD, Brakeman PR.** Renal repair and recovery. *Crit Care Med.* 2008, Vol. 36(4 Suppl), S187-92.
143. **Vogetseder A, Palan T, Bacic D, Kaissling B, Le Hir M.** Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007, Vol. 292(2), C807-13.
144. **Vogetseder A, Picard N, Gaspert A, Walch M, Kaissling B, Le Hir M.** Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008, Vol. 294(1), C22-8.
145. **Kriz W, Gretz N, Lemley KV.** Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int.* 1998, Vol. 54(3), 687-97.
146. **Marshall CB, Shankland SJ.** Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp Nephrol.* 2006, Vol. 102(2), e39-48.
147. **Kelly G, Downie I, Gardiner DS, More IA, Lindop GB.** The peripolar cell: a distinctive cell type in the mammalian glomerulus. Morphological evidence from a study of sheep. *J Anat.* 1990, Vol. 168, 217-27.
148. **Thumwood CM, McCausland J, Alcorn D, Ryan GB.** Scanning and transmission electron-microscopic study of peripolar cells in the newborn lamb kidney. *Cell Tissue Res.* 1993, Vol. 274(3), 597-604.
149. **Bariety J, Mandet C, Hill GS, Bruneval P.** Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol.* 2006, Vol. 17(10), 2770-80.
150. **Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, Elger M, Kriz W, Floege J, Moeller MJ.** Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009, Vol. 20(2), 333-43.
151. **Kim D, Dressler GR.** Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol.* 2005, Vol. 16(12), 3527-34.
152. **Temple S.** The development of neural stem cells. *Nature.* 2001, Vol. 414(6859), 112-7.
153. **Morrison SJ, Kimble J.** Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006, Vol. 441(7097), 1068-74.
154. **Herzlinger D.** Renal stem cells and the lineage of the nephron. *Annu Rev Physiol.* 1994, Vol. 56, 671-89.
155. **Horster MF, Braun GS, Huber SM.** Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev.* 1999, Vol. 79(4), 1157-91.
156. **Schedl A.** Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet.* 2007, Vol. 8(10), 791-802.
157. **Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, Mazzinghi B, Sagrinati C, Netti GS, Angelotti ML, Parente E, Ballerini L, Cosmi L, Maggi L, Gesualdo L, Rotondi M, Annunziato F, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Vannelli GB, Romagnani P.** Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007, Vol. 18(12), 3128-38.
158. **Dekel B, Burakova T, Arditti FD, Reich-Zeliger S, Milstein O, Aviel-Ronen S, Rechavi G, Friedman N, Kaminski N, Passwell JH, Reisner Y.** Human and

- porcine early kidney precursors as a new source for transplantation. *Nat Med.* 2003, Vol. 9(1), 53-60.
159. **Kobayashi A, Valerius MT, Mugford JW, Carroll TJ, Self M, Oliver G, McMahon AP.** Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell.* 2008, Vol. 3(2), 169-81.
160. **Scadden DT.** The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006, Vol. 441(7097), 1075-9.
161. **Li L, Xie T.** Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005, Vol. 21, 605-31.
162. **Walker MR, Patel KK, Stappenbeck TS.** The stem cell niche. *J Pathol.* 2009, Vol. 217(2), 169-80.
163. **Schofield R.** The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978, Vol. 4(1-2), 7-25.
164. **Xie T, Spradling AC.** A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science.* 2000, Vol. 290(5490), 328-30.
165. **Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT.** Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science.* 2001, Vol. 294(5551), 2542-5.
166. **Tulina N, Matunis E.** Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science.* 2001, Vol. 294(5551), 2546-9.
167. **Crittenden SL, Bernstein DS, Bachorik JL, Thompson BE, Gallegos M, Petcherski AG, Moulder G, Barstead R, Wickens M, Kimble J.** A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2002, Vol. 417(6889), 660-3.
168. **Kiger AA, White-Cooper H, Fuller MT.** Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature.* 2000, Vol. 407(6805), 750-4.
169. **Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM.** Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 1990, Vol. 61(7), 1329-37.
170. **Potten CS, Owen G, Booth D.** Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci.* 2002, Vol. 115(Pt 11), 2381-8.
171. **Moore KA, Lemischka IR.** Stem cells and their niches. *Science.* 2006, Vol. 311(5769), 1880-5.
172. **Drummond-Barbosa D.** Stem cells, their niches and the systemic environment: an aging network. *Genetics.* 2008, Vol. 180(4), 1787-97.
173. **Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C.** Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res.* 2007, Vol. 313(16), 3377-85.
174. **Jones PH, Watt FM.** Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell.* 1993, Vol. 73(4), 713-24.
175. **Jensen UB, Lowell S, Watt FM.** The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development.* 1999, Vol. 126(11), 2409-18.
176. **Garcion E, Halilagic A, Faissner A, French-Constant C.** Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development.* 2004, Vol. 131(14), 3423-32.

177. **Ohta M, Sakai T, Saga Y, Aizawa S, Saito M.** Suppression of hematopoietic activity in tenascin-C-deficient mice. *Blood*. 1998, Vol. 91(11), 4074-83.
178. **Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grünewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR, Scadden DT.** Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*. 2005, Vol. 201(11), 1781-91.
179. **Gao S, Steffen J, Laughon A.** Dpp-responsive silencers are bound by a trimeric Mad-Medea complex. *J Biol Chem*. 2005, Vol. 280(43), 36158-64.
180. **Chen D, McKearin D.** Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Curr Biol*. 2003, Vol. 13(20), 1786-91.
181. **Song X, Wong MD, Kawase E, Xi R, Ding BC, McCarthy JJ, Xie T.** Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the Drosophila ovary. *Development*. 2004, Vol. 131(6), 1353-64.
182. **Xie T, Spradling AC.** decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary. *Cell*. 1998, Vol. 94(2), 251-60.
183. **Fuller MT, Spradling AC.** Male and female Drosophila germline stem cells: two versions of immortality. *Science*. 2007, Vol. 316(5823), 402-4.
184. **Kimble J, Crittenden SL.** Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007, Vol. 23, 405-33.
185. **Hansen D, Wilson-Berry L, Dang T, Schedl T.** Control of the proliferation versus meiotic development decision in the *C. elegans* germline through regulation of GLD-1 protein accumulation. *Development*. 2004, Vol. 131(1), 93-104.
186. **Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F.** Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008, Vol. 363(1489), 123-37.
187. **Ohlstein B, McKearin D.** Ectopic expression of the Drosophila Bam protein eliminates oogenic germline stem cells. *Development*. 1997, Vol. 124(18), 3651-62.
188. **Kai T, Spradling A.** Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature*. 2004, Vol. 428(6982), 564-9.
189. **Brawley C, Matunis E.** Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science*. 2004, Vol. 304(5675), 1331-4.
190. **Perry JM, Li L.** Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell*. 2007, Vol. 129(6), 1045-7.
191. **Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, Link DC.** G-CSF potentially inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*. 2005, Vol. 106(9), 3020-7.
192. **Cleaver O, Melton DA.** Endothelial signaling during development. *Nat Med*. 2003, Vol. 9(6), 661-8.
193. **Kimble JE, White JG.** On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1981, Vol. 81(2), 208-19.
194. **Reynolds BA, Weiss S.** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992, Vol. 255(5052), 1707-10.
195. **Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH.** Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science*. 2004, Vol. 304(5675), 1253-5.

196. **Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ.** VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet.* 2004, Vol. 36(8), 827-35.
197. **Lim DA, Alvarez-Buylla A.** Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, Vol. 96(13), 7526-31.
198. **Song H, Stevens CF, Gage FH.** Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 2002, Vol. 417(6884), 39-44.
199. **Potten CS.** Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol.* 1981, Vol. 69, 271-318.
200. **Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y.** Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell.* 1994, Vol. 76(6), 1063-73.
201. **Lechler T, Fuchs E.** Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 2005, Vol. 437(7056), 275-80.
202. **Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A.** Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol.* 2010, Vol. 92, 367-409.
203. **Yin T, Li L.** The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006, Vol. 116(5), 1195-201.
204. **Kiel MJ, Morrison SJ.** Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol.* 2008, Vol. 8(4), 290-301.
205. **Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL.** Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001, Vol. 294(5548), 1933-6.
206. **Perryman SV, Sylvester KG.** Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells. *J Cell Mol Med.* 2006, Vol. 10(2), 292-308.
207. **Potten CS, Wilson JW.** Development of Epithelial Stem cell concepts. *Handbook of Stem Cells.* s.l. : [editor Lanza, R.]; Vol 2, 1-11, 2004.
208. **Slack JM.** Stem cells in epithelial tissues. *Lancet.* 1989, Vol. 1(8650), 1312-5.
209. **Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA.** Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature.* 2005, Vol. 433(7027), 760-4.
210. **Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA.** Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science.* 2007, Vol. 317(5839), 807-10.
211. **Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ.** Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2005, Vol. 106(4), 1479-87.
212. **Romagnani P, Kalluri R.** Possible mechanisms of kidney repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2009, Vol. 2(1), 3.
213. **Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, Westmoreland SV, Chambon P, Scadden DT, Purton LE.** A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell.* 2007, Vol. 129(6), 1097-110.
214. **Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH.** Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell.* 2007, Vol. 129(6), 1081-95.
215. **Young NS, Maciejewski J.** The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med.* 1997, Vol. 336(19), 1365-72.
216. **Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V.** The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal

- segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 1999, Vol. 10(1), 51-61.
217. **Thorner PS, Ho M, Eremina V, Sado Y, Quaggin S.** Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents. *J Am Soc Nephrol.* 2008, Vol. 19(3), 495-502.
218. **Barisoni L, Nelson PJ.** Collapsing glomerulopathy: an inflammatory podocytopathy? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007, Vol. 16(3), 192-5.
219. **Albaqumi M, Barisoni L.** Current views on collapsing glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008, Vol. 19(7), 1276-81.
220. **Smeets B, Te Loeke NA, Dijkman HB, Steenbergen ML, Lensen JF, Begieneman MP, van Kuppevelt TH, Wetzels JF, Steenbergen EJ.** The parietal epithelial cell: a key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *J Am Soc Nephrol.* 2004, Vol. 15(4), 928-39.
221. **Chambers SM, Shaw CA, Gatzka C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA.** Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 2007, Vol. 5(8), e201.
222. **Hayward P, Kalmar T, Arias AM.** Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development.* 2008, Vol. 135(3), 411-24.
223. **Mohr OL.** Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics.* 1919, Vol. 4(3), 275-82.
224. **Morgan TH, Bridges CB.** Sex-linked inheritance in *Drosophila*. *Publs Carnegie Instn.* 1916, Vol. 273, 1-88.
225. **Poulson DF.** The effects of certain X-chromosome deficiencies on the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool.* Vol. 83, 271–325.
226. **Greenwald I, Rubin GM.** Making a difference: The role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell.* 1992, Vol. 68(2), 271–81.
227. **Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME.** Notch signaling. *Science.* 1995, Vol. 268(5208), 225–32.
228. **Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S.** Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell.* 1985, Vol. 43(3 pt 2), 567-81.
229. **Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MA, Artavanis-Tsakonas S.** Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell.* 1990, Vol. 61(3), 523-34.
230. **Greenwald IS, Sternberg PW, Horvitz HR.** The *lin-12* locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Cell.* 1983, Vol. 34(2), 435–44.
231. **Coffman C, Harris W, Kintner C.** Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch. *Science.* 1990, Vol. 249(4975), 1438-41.
232. **Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J.** TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 1991, Vol. 66(4), 649-61.
233. **Baron M, Aslam H, Flaszka M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, Wilkin MB.** Multiple levels of Notch signal regulation. *Mol Membr Biol.* 2002, Vol. 19(1), 27-38.
234. **Bray J.** Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006, Vol. 7(9), 678-89.

235. **Baron M.** An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2003, Vol. 14(2), 113-9.
236. **Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S.** Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell.* 1991, Vol. 67(4), 687-99.
237. **Weber JM, Calvi LM.** Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone.* 2010, Vol. 46(2), 281-5.
238. **Wolfe MS, Kopan R.** Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science.* 2004, Vol. 305(5687), 1119–23.
239. **Weber JM, Calvi LM.** Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone.* 2010, Vol. 46(2), 281-285.
240. **Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T.** A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* 1998, Vol. 12(15), 2269-77.
241. **Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD.** MAML1, a human homologue of Drosophila Mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet.* 2000, Vol. 26(4), 484-9.
242. **Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD.** SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol.* 2000, Vol. 20(7), 2400-10.
243. **Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R.** Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res.* 2005, Vol. 306(2), 343-8.
244. **Iso T, Kedes L, Hamamori Y.** HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2003, Vol. 194(3), 237255.
245. **Artavanis-Tsakonas S, Muskavitch MA.** Notch: the past, the present, and the future. *Curr Top Dev Biol.* 2010, Vol. 92, 1-29.
246. **Shi S, Stanley P.** Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci.* 2003, Vol. 100(9), 5234–9.
247. **Okajima T, Irvine KD.** Regulation of Notch signaling by O-linked fucose. *Cell.* 2004, Vol. 111(6), 893–904.
248. **Okajima T, Xu A, Lei L, Irvine KD.** Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science.* 2005, Vol. 307(5715), 1599–603.
249. **Yang LT, Nichols JT, Yao C, Manilay JO, Robey EA, Weinmaster G.** Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Mol. Biol. Cell.* 2005, Vol. 16(2), 927–42.
250. **Ikeuchi T, Sisodia SS.** The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent “g-secretase” cleavage. *J Biol Chem.* 2003, Vol. 278(10), 7751–4.
251. **LaVoie MJ, Selkoe DJ.** The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by a-secretase and presenilin/g-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem.* Vol. 278(36), 34427–37.
252. **Wesley CS, Saez L.** Analysis of Notch lacking the carboxyl terminus identified in Drosophila embryos. *J Cell Biol.* 2000, Vol. 149(3), 683-96.
253. **Seugnet L, Simpson P, Haenlin M.** Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis. *Dev Biol.* 1997, Vol. 192(2), 585–98.

254. **Parks AL, Klueg KM, Stout JR, Muskavitch MAT.** Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development*. 2000, Vol. 127(7), 1373–85.
255. **Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A.** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 2000, Vol. 5(2), 207-16.
256. **Gordon WR, Vardar-Ulu D, Histen G, Sanchez-Irizarry C, Aster JC, Blacklow SC.** Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol*. 2007, Vol. 14(4), 295-300.
257. **Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F.** The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development*. 2005, Vol. 132(8), 1751–62.
258. **Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, Weissman AM, Lewis J, Chandrasekharappa SC, Chitnis AB.** Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell*. 2003, Vol. 4(1), 67-82.
259. **McGill MA, McGlade CJ.** Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *Pain*. 2003, Vol. 106(3), 357-63.
260. **Hutterer A, Knoblich JA.** Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in Drosophila external sensory organs. *EMBO Rep*. 2005, Vol. 6(9), 836-42.
261. **Le Borgne R, Schweisguth F.** Unequal Segregation of Neuralized Biases Notch Activation during Asymmetric Cell Division. *Dev Cell*. 2003, Vol. 5(1), 139-48.
262. **Emery G, Hutterer A, Berdnik D, Mayer B, Wirtz-Peitz F, Gaitan MG, Knoblich JA.** Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the Drosophila nervous system. *Cell*. 2005, Vol. 122(5), 763-73.
263. **Jafar-Nejad H, Andrews HK, Acar M, Bayat V, Wirtz-Peitz F, Mehta SQ, Knoblich JA, Bellen HJ.** Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of Drosophila sensory organ precursors. *Dev Cell*. 2005, Vol. 9(3), 351-63.
264. **Coumailleau F, Fürthauer M, Knoblich JA, González-Gaitán M.** Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature*. 2009, Vol. 458(7241), 1051-5.
265. **Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ.** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999, Vol. 284(5415), 770-6.
266. **Beatus P, Lendahl U.** Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res*. 1998, Vol. 54(2), 125-36.
267. **Kopan R, Turner DL.** The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr Opin Neurobiol*. 1996, Vol. 6(5), 594-601.
268. **Lewis J.** Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol*. 1998, Vol. 9(6), 583-9.
269. **Muskavitch MA.** Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol*. 1994, Vol. 166(2), 415-30.
270. **Kurata S, Go MJ, Artavanis-Tsakonas S, Gehring WJ.** Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, Vol. 97(5), 2117–22.

271. **Lanford PJ, Lan Y, Jiang R, Lindsell C, Weinmaster G, Gridley T, Kelley MW.** Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet.* 1999, Vol. 21(3), 289-92.
272. **Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H.** Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature.* 1999, Vol. 400(6747), 877-81.
273. **van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H.** Notch/g-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature.* 2005, Vol. 435(7044), 959-63.
274. **Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G, Salmon P.** An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell.* 1996, Vol. 87(3), 483-92.
275. **Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes BJ, Cado D, Robey E.** Notch activity influences the ab versus gd T cell lineage decision. *Cell.* 1997, Vol. 88(6), 833-43.
276. **Wilson A, Radtke F.** Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Letters.* 2006, Vol. 580(12), 2860-8.
277. **Chiba S.** Concise Review: Notch Signaling in Stem Cell Systems. *Stem Cells.* 2006, Vol. 24(11), 2437-2447.
278. **Gridley T.** Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Gen.* 2003, Vol. 12(1), 9-13.
279. **Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont ME, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB.** Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet.* 1997, Vol. 16(3), 243-51.
280. **Oda T, Elkahoul AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC.** Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet.* 1997, Vol. 16(3), 235-42.
281. **Maroto M, Pourquié O.** A molecular clock involved in somite segmentation. *Curr Top Dev Biol.* 2001, Vol. 51, 221-48.
282. **Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cécillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E.** Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature.* 1996, Vol. 383(6602), 707-10.
283. **Pan Y, Lin MH, Tian X, Cheng HT, Gridley T, Shen J, Kopan R.** gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev Cell.* 2004, Vol. 7(5), 731-43.
284. **Vauclair S, Nicolas M, Barrandon Y, Radtke F.** Notch1 is essential for postnatal hair follicle development and homeostasis. *Dev Biol.* 2005, Vol. 284(1), 184-93.
285. **Lin MH, Leimeister C, Gessler M, Kopan R.** Activation of the Notch pathway in the hair cortex leads to aberrant differentiation of the adjacent hair-shaft layers. *Development.* 2000, Vol. 127(11), 2421-32.
286. **Uyttendaele H, Panteleyev AA, de Berker D, Tobin DT, Christiano AM.** Activation of Notch1 in the hair follicle leads to cell-fate switch and Mohawk alopecia. *Differentiation.* 2004, Vol. 72(8), 396-409.

287. **Yamamoto N, Tanigaki K, Han H, Hiai H, Honjo T.** Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicular stem cells. *Curr Biol.* 2003, Vol. 13(4), 333-8.
288. **Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F.** Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet.* 2003, Vol. 33(3), 416-21.
289. **Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR.** Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004, Vol. 5(3), 247-53.
290. **Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H.** Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity.* 2003, Vol. 18(5), 699-711.
291. **Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID.** Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med.* 2000, Vol. 6(11), 1278-81.
292. **Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT.** Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood.* 2002, Vol. 99(7), 2369-78.
293. **Li L, Milner LA, Deng Y, Iwata M, Banta A, Graf L, Marcovina S, Friedman C, Trask BJ, Hood L, Torok-Storb B.** The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity.* 1998, Vol. 8(1), 43-55.
294. **Renström J, Kröger M, Peschel C, Oostendorp RA.** How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact.* 2010, Vol. 184(1-2), 7-15.
295. **Schroeder T, Just U.** mNotch1 signaling reduces proliferation of myeloid progenitor cells by altering cell-cycle kinetics. *Exp Hematol.* 2000, Vol. 28(11), 1206-13.
296. —. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J.* 2000, Vol. 19(11), 2558-68.
297. **Maillard I, Fang T, Pear WS.** Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol.* 2005, Vol. 23, 945-74.
298. **Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, Mathas S, Stein H, Dörken B.** Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2002, Vol. 99(9), 3398-403.
299. **Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD.** Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet.* 2000, Vol. 24(1), 36-44.
300. **Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S.** Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature.* 2005, Vol. 435(7044), 964-8.
301. **Radtke F, Clevers H.** Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science.* 2005, Vol. 307(5717), 1904-9.
302. **Conboy IM, Rando TA.** The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell.* 2002, Vol. 3(3), 397-409.
303. **Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE.** Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 2005, Vol. 122(2), 289-301.

304. **Miller JB, Emerson CP Jr.** Does the road to muscle rejuvenation go through Notch? *Sci Aging Knowledge Environ.* 2003, Vol. 2003(48), pe34.
305. **Collesi C, Zentilin L, Sinagra G, Giacca M.** Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes. *J Cell Biol.* 2008, Vol. 183(1), 117-28.
306. **Zhong W, Jiang MM, Weinmaster G, Jan LY, Jan YN.** Differential expression of mammalian Numb, Numbl like and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Development.* 1997, Vol. 124(10), 1887-97.
307. **Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RD.** Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature.* 2006, Vol. 442(7104), 823-6.
308. **Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, Fairman RM, Velazquez OC, Herlyn M.** Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 2003, Vol. 23(1), 14-25.
309. **Handler M, Yang X, Shen J.** Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development.* 2000, Vol. 127(12), 2593-606.
310. **Grandbarbe L, Bouissac J, Rand M, Hrabé de Angelis M, Artavanis-Tsakonas S, Mohier E.** Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development.* 2003, Vol. 130(7), 1391-402.
311. **Presente A, Andres A, Nye JS.** Requirement of Notch in adulthood for neurological function and longevity. *Neuroreport.* 2001, Vol. 12(15), 3321-5.
312. **Lathia JD, Mattson MP, Cheng A.** Notch: from neural development to neurological disorders. *J Neurochem.* 2008, Vol. 107(6), 1471-81.
313. **Selkoe D, Kopan R.** Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2003, Vol. 26, 565-97.
314. **Sagrinati C, Ronconi E, Lazzeri E, Lasagni L, Romagnani P.** Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells. *Trends Mol Med.* 2008, Vol. 14(7), 277-85.
315. **Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, Lazzeri E, Beltrame C, Francalanci M, Ugucioni M, Galli G, Cosmi L, Maurenzig L, Baggolini M, Maggi E, Romagnani S, Serio M.** Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest.* 2001, Vol. 107(1), 53-63.
316. **Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, Sagrinati C, Mazinghi B, Orlando C, Maggi E, Marra F, Romagnani S, Serio M, Romagnani P.** An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med.* 2003, Vol. 197(11), 1537-49.
317. **Kita A, Imayoshi I, Hojo M, Kitagawa M, Kokubu H, Ohsawa R, Ohtsuka T, Kageyama R, Hashimoto N.** Hes1 and Hes5 control the progenitor pool, intermediate lobe specification, and posterior lobe formation in the pituitary development. *Mol Endocrinol.* 2007, Vol. 21(6), 1458-66.
318. **Woo SM, Kim J, Han HW, Chae JI, Son MY, Cho S, Chung HM, Han YM, Kang YK.** Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells. *BMC Neurosci.* 2009, Vol. 10, 97.

319. **Pippin JW, Durvasula R, Petermann A, Hiromura K, Couser WG, Shankland SJ.** DNA damage is a novel response to sublytic complement C5b-9-induced injury in podocytes. *J Clin Invest.* 2003, Vol. 111(6), 877-85.
320. **Lee VW, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Mahajan D, Coombes J, Rangan G, Alexander SI, Harris DC.** Adriamycin nephropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2006, Vol. 21(11), 3293-8.
321. **Smeets B, Uhlig S, Fuss A, Mooren F, Wetzels JF, Floege J, Moeller MJ.** Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009, Vol. 20(12), 2604-15.
322. **Shankland SJ, Floege J, Thomas SE, Nangaku M, Hugo C, Pippin J, Henne K, Hockenberry DM, Johnson RJ, Couser WG.** Cyclin kinase inhibitors are increased during experimental membranous nephropathy: potential role in limiting glomerular epithelial cell proliferation in vivo. *Kidney Int.* 1997, Vol. 52(2), 404-13.
323. **Schiffer M, Schiffer LE, Gupta A, Shaw AS, Roberts IS, Mundel P, Böttinger EP.** Inhibitory smads and tgf-Beta signaling in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002, Vol. 13(11), 2657-66.
324. **Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G et al. Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009, Vol. 16(1), 3-11.
325. **Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B.** Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 2008, Vol. 15(7), 1153-62.
326. **Ianzini F, Mackey MA.** Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells. *Mutagenesis.* 1998, Vol. 13(4), 337-44.
327. **Dini L, Coppola S, Ruzittu MT, Ghibelli L.** Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp Cell Res.* 1996, Vol. 223(2), 340-7.
328. **Roninson IB, Broude EV, Chang BD.** If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat.* 2001, Vol. 4(5), 303-13.
329. **Kriz W, Hähnel B, Rösener S, Elger M.** Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1995, Vol. 48(5), 1435-50.
330. **Nagata M, Kriz W.** Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int.* 1992, Vol. 42(1), 148-60.
331. **Huang XR, Holdsworth SR, Tipping PG.** Evidence for delayed-type hypersensitivity mechanisms in glomerular crescent formation. *Kidney Int.* 1994, Vol. 46(1), 69-78.
332. **Tenschert S, Elger M, Lemley KV.** Glomerular hypertrophy after subtotal nephrectomy: relationship to early glomerular injury. *Virchows Arch.* 1995, Vol. 426(5), 509-17.
333. **Nagata M, Yamaguchi Y, Komatsu Y, Ito K.** Mitosis and the presence of binucleate cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys. *Nephron.* 1995, Vol. 70(1), 68-71.
334. **Olsen S.** Extracapillary glomerulonephritis. A semiquantitative lightmicroscopical study of 59 patients. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl.* 1974, Vol. Suppl 249, 7-19.

335. **Lewis EJ, Cavallo T, Harrington JT, Cotran RS.** An immunopathologic study of rapidly progressive glomerulonephritis in the adult. *Hum Pathol.* 1971, Vol. 2(2), 185-208.
336. **Spear G.** The proximal tubule and the podocyte in cystinosis. *Nephron.* 1973, Vol. 10(1), 57-60.
337. **Glotzer M.** The molecular requirements for cytokinesis. *Science.* 2005, Vol. 307(5716), 1735-9.
338. **Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P.** Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2007, Vol. 17(9), 428-37.
339. **Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB.** Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest.* 2006, Vol. 116(5), 1346-59.
340. **Remuzzi G, Remuzzi A.** Is regression of chronic nephropathies a therapeutic target? *J Am Soc Nephrol.* 2005, Vol. 16(4), 840-2.
341. **Morrissey J, Guo G, Moridaira K, Fitzgerald M, McCracken R, Tolley T, Klahr S.** Transforming growth factor-beta induces renal epithelial jagged-1 expression in fibrotic disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002, Vol. 13(6), 1499-508.
342. **Niranjan T, Bielez B, Gruenwald A, Ponda MP, Kopp JB, Thomas DB, Susztak K.** The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nat Med.* 2008, Vol. 14(3), 290-8.
343. **Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, Zanchi C, Longaretti L, Donadelli R, Remuzzi G.** Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* 2002, Vol. 161(6), 2179-93.
344. **Waters AM, Wu MY, Onay T, Scutaru J, Liu J, Lobe CG, Quaggin SE, Piscione TD.** Ectopic notch activation in developing podocytes causes glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008, Vol. 19(6), 1139-57.
345. **Niranjan T, Murea M, Susztak K.** The pathogenic role of Notch activation in podocytes. *Nephron Exp Nephrol.* 2009, Vol. 111(4), e73-9.

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

ABC G1	<i>ATP-binding Cassette Superfamily G member 1</i>
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AGM	<i>Aorta-Gonadi-Mesonefro</i>
APH1	<i>Anterior Pharynx-defective 1</i>
ASC	<i>Adult Stem Cells</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH	<i>basic Helix-loop-helix</i>
BM	<i>Bone Marrow</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BrdU	<i>Bromodesossiuridina</i>
CADASIL	<i>Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CFU-S	<i>Colony Forming Units-Spleen</i>
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
DPP	<i>Decapentaplegic</i>
DTC	<i>Distal Tip Cell</i>
ECM	<i>Extra-Cellular Matrix</i>
EGC	<i>Embryonic Germ Cells</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cells</i>
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i>
ESRD	<i>End-Stage Renal Disease</i>
FSGS	<i>Focal Segmental Glomerulosclerosis</i>
GBB	<i>Glass bottom boat</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i>
HES	<i>Hairy/enhancer of Split</i>
Hey	<i>Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
ICM	<i>Inner Cell Mass</i>
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
JAK/STAT	<i>Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of</i>

	<i>Transcription</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LT-HSC	<i>Long term-HSC</i>
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i>
MAPC	<i>Multipotent Adult Progenitor Cells</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinases</i>
MDR	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MET	<i>Mesenchyme to Epithelium Transdifferentiation</i>
MM	<i>Mesenchima Metanefrico</i>
MRF	<i>Myogenesis Regulation Factors</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NEXT	<i>Notch Extracellular Truncation</i>
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NLS	<i>Nuclear-localization Sequence</i>
NSC	<i>Neural Stem Cells</i>
O-Fut/Pofut-1	<i>O-fucosil-transferasi</i>
PDX	<i>Podocalixina</i>
PEN2	<i>Presenilin Enhancer 2</i>
PEST	<i>prolina-glutammato-serina-treonina</i>
PGC	<i>Primordial Germ Cells</i>
PI	<i>Ioduro di propidio</i>
PSEN	<i>Presenilina</i>
RAM	<i>RBP-j_k Associated Molecule</i>
RBP-J_k	<i>Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SC	<i>Stem Cells</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor-1</i>
SGZ	<i>Subgranular Zone</i>
SKIP	<i>Ski-interacting Protein</i>
SNC	<i>Sistema Nervoso Centrale</i>
ST-HSC	<i>Short term-HSC</i>
SVZ	<i>Subventricular Zone</i>
TAC	<i>Transit-amplifying Cell</i>
TACE	<i>TNF-α Converting Enzyme</i>
TAD	<i>Transcriptional Activator Domain</i>
T-ALL	<i>T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
TCR	<i>T-cell Receptor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
UB	<i>Ureteric Bud</i>
UPD	<i>Unpaired</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2</i>
vWF	<i>Fattore von Willebrand</i>
WNTs	<i>Wingless-related protein</i>