

Titolo: L'induzione della differenziazione nelle cellule staminali del teratocarcinoma da parte dell'acido retinoico - The Induction of Differentiation in Teratocarcinoma Stem Cells by Retinoic Acid.

Codice: RET003

Autore: Strickland e Mahdavi

Data: 1978

Rivista: Cell 15: 393-403

Argomento: retinoidi

Accesso libero: no

DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90008-9)

URL: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(78\)90008-9.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(78)90008-9.pdf)

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2023/01/08/ret003-strickland-e-mahdavi-1978/>

Parole chiave: vitamina a, retinoidi, differenziazione, teratocarcinoma, carcinoma embrionale, attivatore del plasminogeno, cellule staminali

Tumore: carcinoma embrionale

Traduzione: tradotto tutto l'articolo (tranne la sezione finale con la descrizione della metodologia e procedure degli esperimenti) con alcune minime semplificazioni.

Punti di interesse: In questo studio cellule staminali di teratocarcioma sono state trattate con retinoidi ed è stato evidenziato che i retinoidi inducono un differenziamento trasformando queste cellule in endoderma. L'endoderma è uno dei primi tessuti a formarsi nell'embrione a poche settimane di vita, da cui si originano altre cellule e tessuti di diversi organi durante lo sviluppo dell'embrione. Segue una sintesi dell'articolo con i suoi punti salienti.

L'analisi del differenziamento cellulare è spesso ostacolata da diversi fattori quali un numero insufficiente di cellule staminali, l'eterogeneità delle popolazioni di partenza, l'incapacità di intervenire nei processi di sviluppo, la necessità di individuare delle molecole come marcatori per individuare la cellula/tessuto differenziato. Per lo studio dell'eritropoiesi erano usati modelli partendo da cellule leucemiche indotte da virus che si comportano come cellule precursori di eritrociti, di cui si poteva indurre sviluppo in eritrociti maturi, studiando questo processo con l'emoglobina come marker.

I teratocarcinomi dei topi contengono cellule staminali che possono differenziarsi in molti tessuti e questo sembrava offrire la possibilità di poter usare queste cellule per sistemi modello per lo studio dell'embriogenesi. Nelle linee cellulari sviluppate da teratocarcinomi la capacità delle cellule di differenziarsi in diversi tipi cellulari è stata fortemente diminuita, e le cellule in coltura o i tumori in vivo derivati da queste colture sono composti quasi esclusivamente da cellule di carcinoma embrionale, le cellule staminali dei teratocarcinomi. In molti casi l'endoderma è uno dei primi tipi tessuti cellulari a svilupparsi da cellule di carcinoma embrionale. Recentemente è stato dimostrato che cellule endodermiche che derivano dall'embrione precoce di topo o da cellule di carcinoma embrionale producono la serina proteasi attivatore del plasminogeno (enzima che trasforma il plasminogeno in plasmina, che a sua volta è un enzima per la degradazione della fibrina. Sono

molecole coinvolte nella coagulazione del sangue). Si è così provato ad usare questo enzima attivatore del plasminogeno come marker per le cellule dell'endoderma.

Precedenti studi avevano già evidenziato la possibile influenza dei composti della vitamina A sulla differenziazione e sull'induzione della sintesi dell'attivatore del plasminogeno nei fibroblasti dell'embrione di pollo da parte dell'acido retinoico. Sulla base di questi studi, abbiamo testato vari retinoidi, e altri composti sulle cellule F9, una linea cellulare di teratocarcinoma che subisce una differenziazione molto limitata in normali condizioni di coltura. L'attivatore del plasminogeno è stato utilizzato come marcatore per l'endoderma.

L'acido retinoico a basse concentrazioni induce la sintesi e la secrezione dell'attivatore del plasminogeno nelle colture F9. Prove morfologiche e biochimiche suggeriscono che questo risultato è una conseguenza della differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale nell'endoderma.

Osservazioni morfologiche

L'aggiunta di 10^{-7} M di acido retinoico alla coltura determina un pronunciato cambiamento morfologico e il nuovo aspetto di queste cellule è sorprendentemente simile a quello delle cellule differenziate derivate e ricorda da vicino il presunto endoderma.

Esame dei marcatori biochimici

Produzione dell'enzima attivatore del plasminogeno

È stato dimostrato che le cellule di carcinoma embrionale non secernono livelli apprezzabili di questo enzima, ma che le cellule endodermiche che si differenziano da queste cellule sì. È stato riportato che la produzione di attivatore del plasminogeno nelle cellule dell'endoderma derivate dal teratocarcinoma è aumentata aumentando la concentrazione intracellulare di cAMP. Le cellule F9 cresciute in condizioni standard producono quantità molto basse di attivatore del plasminogeno. La quantità di enzima aumenta leggermente ma in modo riproducibile in queste colture all'aumentare della densità cellulare. L'aggiunta di acido retinoico alle colture, tuttavia, aumenta la secrezione dell'attivatore del plasminogeno di oltre 10 volte in 3 giorni di coltura.

Alla luce dell'effetto del cAMP sull'endoderma sopra descritto, era interessante esaminare la sensibilità delle colture di cellule F9 al cAMP. Questo composto da solo ha scarso effetto sulle colture F9, ma il trattamento con dibutiril cAMP (DbcAMP) e acido retinoico presi insieme, tuttavia, hanno un apparente effetto sinergico sulla secrezione di proteasi. L'azione di DbcAMP nelle colture trattate con acido retinoico non è immediata ma richiede diversi giorni per manifestarsi.

Pertanto, utilizzando la morfologia, la produzione di attivatore del plasminogeno e la sensibilità a DbcAMP come criteri per l'identificazione, il tipo di cellula generato dal trattamento delle cellule F9 con acido retinoico è simile all'endoderma.

Sintesi di proteine simili al collagene

Le cellule dell'endoderma parietale sintetizzano, in vivo e in vitro, una spessa membrana basale, la membrana di Reichert, che è noto contenere tra il 20 e il 50% di collagene. Per questo motivo, abbiamo esaminato colture F9 in presenza e in assenza di acido retinoico per la sintesi di proteine simili al collagene. Il trattamento con acido retinoico induce le cellule F9 alla produzione di proteine con peso molecolare molto simile al collagene e che vengono digerite da una collagenasi.

Fosfatasi alcalina

È stato suggerito che la diminuzione dell'attività specifica della fosfatasi alcalina può servire come indicatore della differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale. La presenza di acido retinoico determina un aumento di circa 2 volte nelle cellule trattate di produzione di fosfatasi

alcalina. Va notato che, contrariamente all'effetto sui livelli dell'attivatore del plasminogeno, una combinazione di acido retinoico e DbcAMP non ha un apparente effetto sinergico sui livelli di fosfatasi alcalina.

Discussione

I dati qui presentati sono coerenti con l'interpretazione secondo cui le cellule di carcinoma embrionale F9 possono essere indotte dall'acido retinoico a differenziarsi in endoderma. Chiaramente, ulteriori esami dovrebbero essere eseguiti per verificare questa conclusione provvisoria. Diverse linee di evidenza implicano che il tipo cellulare che si accumula nelle colture F9 trattate con acido retinoico sia l'endoderma. Le somiglianze tra questo tipo cellulare e l'endoderma "nativo" sono: la produzione dell'attivatore del plasminogeno, il peso molecolare apparente della proteasi, la sensibilità della produzione di enzimi a livelli elevati di cAMP e la sintesi e la secrezione di una proteina simile al collagene. L'osservazione che il trattamento delle cellule F9 con acido retinoico aumenta l'attività specifica della fosfatasi alcalina è in contrasto con l'ipotesi che la differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale si traduce invariabilmente in una diminuzione della fosfatasi alcalina. Tuttavia, altri studi hanno messo in discussione che un'immediata diminuzione del contenuto di fosfatasi alcalina debba accompagnare la differenziazione del carcinoma embrionale in endoderma.

L'influenza dell'acido retinoico sulla differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale è notevole per il fatto che la vitamina A è nota essere coinvolta nella differenziazione da oltre cinquant'anni. L'interesse per i retinoidi è stato accresciuto anche dal suggerimento che questi composti potrebbero rivelarsi utili nella prevenzione di alcuni tumori epiteliali. Sembra quindi ragionevole suggerire che gli studi sulla transizione indotta chimicamente del carcinoma embrionale in altri tipi di cellule potrebbero fornire informazioni sui meccanismi coinvolti nella differenziazione e sul possibile ruolo dei derivati della vitamina A in questi meccanismi.

Glossario

Teratoma: un tipo di tumore a cellule germinali costituito da diversi tipi di tessuto provenienti da uno o più strati di cellule germinali; di solito si trova nelle ovaie o nei testicoli e può essere benigno o maligno.

Teratocarcinoma: Tumore maligno costituito istologicamente da cellule indifferenziate appartenenti a vari tessuti e da cellule maligne allo stadio embrionale (carcinoma embrionale). È un tumore tendenzialmente aggressivo che produce in breve tempo metastasi e che si localizza più spesso nei testicoli.

Carcinoma embrionale: è un tipo relativamente raro di tumore delle cellule germinali che si verifica nelle ovaie e nei testicoli

Cellule del carcinoma embrionale: sono state le prime cellule pluripotenti identificate. Queste cellule sono state derivate da tumori a cellule germinali maligni chiamati teratocarcinomi. Questi tumori sono caratterizzati dalla presenza di tipi cellulari di tutti e tre gli strati germinali, nonché di cellule indifferenziate. Le cellule EC di topo sono state inizialmente derivate da tumori testicolari e sono state utilizzate come modelli di sviluppo in vitro.

Attivatore del plasminogeno: Gli attivatori del plasminogeno sono serin-proteasi enzimi che catalizzano l'attivazione della plasmina modificando biochimicamente il suo precursore, il

plasminogeno. La plasmina è un fattore importante nella fibrinolisi, la scomposizione dei polimeri di fibrina formati durante la coagulazione del sangue.

Endoderma: in biologia umana, con endoderma si intende il foglietto embrionale più interno, che si forma nell'embrione all'inizio della terza settimana di vita intrauterina. La prima differenziazione di un embrione in diversi strati cellulari determina la formazione di 3 foglietti embrionali; ectoderma, endoderma e mesoderma, dai quali successivamente si sviluppano strutture, tessuti e organi differenti.

cAMP: Adenosina monofosfato ciclico (cAMP) è prodotto dalle cellule grazie all'enzima adenilato ciclasi a partire dall'ATP. È un importante "secondo messaggero" coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale all'interno delle cellule in risposta a vari stimoli che non sono in grado di attraversare la membrana cellulare. Molti ormoni e neuroormoni producono i loro effetti modificando la concentrazione di cAMP nella cellula. Regola la funzionalità di diversi enzimi e processi cellulari.

Fosfatasi alcalina (ALP): enzima appartenente alla classe delle idrolasi ed è composta principalmente da tre forme (epatobiliare, ossa, intestino), più una forma transitoria durante la gravidanza (forma placentare). E' presente in vari tessuti del corpo, come fegato, ossa, reni, intestino e placenta della gravidanza. Le concentrazioni più elevate di questo enzima si possono osservare nelle ossa e nelle cellule epatiche. Sono catalizzatori biochimici della reazione di defosforilazione, ovvero facilitano l'eliminazione di un gruppo fosforico di una molecola. E' chiamata alcalina perché lavora in ambiente con $\text{pH} > 7$ (alcalino).

Traduzione articolo

Riassunto

Le cellule di carcinoma embrionale, le cellule staminali dei teratocarcinomi, di solito subiscono un'ampia differenziazione in vivo e in vitro in un'ampia varietà di tipi cellulari. Esistono, tuttavia, diverse linee cellulari di carcinoma embrionale che hanno perso quasi completamente la capacità di differenziarsi, cosicché le cellule si propagano principalmente come cellule staminali. Usando una di queste linee cellulari, F9, abbiamo scoperto che l'acido retinoico a concentrazioni fino a 10^{-9} M induce molteplici cambiamenti fenotipici nelle colture in vitro. Questi cambiamenti includono alterazioni morfologiche alla risoluzione del microscopio ottico, livelli elevati di produzione di attivatore del plasminogeno, sensibilità ai composti ciclici dell'AMP e aumento della sintesi di proteine simili al collagene. La natura di questi cambiamenti, così come la loro indipendenza dalla continua presenza di acido retinoico, sono coerenti con l'affermazione che l'acido retinoico induce la differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale nell'endoderma.

Introduzione

L'analisi del differenziamento cellulare è spesso ostacolata da fattori quali un numero insufficiente di cellule staminali, l'eterogeneità delle popolazioni di partenza e l'incapacità di intervenire nei processi di sviluppo. Recentemente, tuttavia, la scoperta che le cellule leucemiche indotte da virus murino si comportano come cellule precursori degli eritrociti bloccate allo stadio proeritroblastico ed eritroblastico (Friend, Patuleia e de Harven, 1966), e la successiva scoperta che alcune sostanze chimiche possono indurre le cellule bloccate a svilupparsi in eritrociti maturi (Friend et al., 1971), hanno messo a disposizione un sistema sperimentale che aggira alcuni di questi problemi nello studio dell'eritropoiesi.

L'indagine sulla biochimica del primo sviluppo dei mammiferi ha risentito della mancanza di un

sistema modello analogo a quello trovato per l'eritropoiesi. Così la consapevolezza che i teratocarcinomi dei topi contengono cellule staminali che possono differenziarsi in molti tessuti diversi (Pierce e Dixon, 1959; Stevens, 1960), che le cellule staminali assomigliano molto alle cellule germinali primordiali (Pierce, Stevens e Nakane, 1967) e all'ectoderma embrionale (Damjanov e Solter, 1975) ha offerto la speranza che lo sviluppo di queste cellule potesse essere utilizzato come paradigma per la normale embriogenesi. Tuttavia, sebbene le cellule potessero essere ottenute in numero abbondante, la loro differenziazione era caotica e imprevedibile, e di conseguenza era difficile studiarle.

Molte delle linee cellulari sviluppate da teratocarcinomi (Bernstine et al., 1973) sono analoghe per molti aspetti agli eritroblasti infettati dal virus Friend. In queste linee, la capacità delle cellule di differenziarsi in diversi tipi cellulari è stata fortemente diminuita, e le cellule in coltura o i tumori in vivo derivati da queste colture sono composti quasi esclusivamente da cellule di carcinoma embrionale, le cellule staminali dei teratocarcinomi (Kleinsmith e Pierce, 1964). Mentre il sistema cellulare dell'eritroleucemia può fare affidamento sulla produzione di emoglobina come marcatore per le cellule differenziate, l'indagine sui fattori che possono influenzare lo sviluppo delle cellule di carcinoma embrionale è stata ostacolata dalla mancanza di un tale marcatore adeguatamente definito e conveniente.

Recentemente è stato dimostrato che cellule endodermiche derivano dall'embrione precoce di topo (Strickland, Reich e Sherman, 1976) o da cellule di carcinoma embrionale (Sherman, Strickland e Reich, 1976; Topp et al., 1976; Linney e Levinson, 1977) producono la serin proteasi attivatore del plasminogeno. Questa osservazione ha rilevanza per gli studi sulla differenziazione del teratocarcinoma, poiché in molti casi l'endoderma è uno dei primi tipi cellulari a svilupparsi da cellule di carcinoma embrionale (Martin e Evans, 1975). Quindi un approccio allo studio della differenziazione di queste cellule sarebbe quello di esaminare colture cresciute in varie condizioni per la produzione di attivatore del plasminogeno. Questo approccio è stato infatti utilizzato con successo per confermare precedenti osservazioni (Rosenthal, Wishnow e Sato, 1970; Martin e Evans, 1975) che l'aggregazione delle cellule staminali può indurre una differenziazione limitata (Sherman et al., 1976).

In questo studio, l'attivatore del plasminogeno è stato utilizzato come marcatore per esaminare una varietà di composti per il loro effetto sulle cellule F9, una linea cellulare di teratocarcinoma che subisce una differenziazione molto limitata in normali condizioni di coltura. In considerazione dell'influenza stabilita dei composti della vitamina A sulla differenziazione (Wolbach e Howe, 1925) e dell'induzione della sintesi dell'attivatore del plasminogeno nei fibroblasti dell'embrione di pollo da parte dell'acido retinoico (Wilson e Reich, 1978), abbiamo testato vari retinoidi, e altri composti. Abbiamo scoperto che l'acido retinoico a basse concentrazioni induce la sintesi e la secrezione dell'attivatore del plasminogeno nelle colture F9. Le prove morfologiche e biochimiche suggeriscono che questo risultato è una conseguenza della differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale nell'endoderma.

Risultati

Osservazioni morfologiche

Le cellule F9 crescono in coltura come colonie fitte di cellule di carcinoma embrionale (Figura 1A). La popolazione cellulare appare prevalentemente omogenea, occasionalmente si osservano gruppi di cellule con morfologia differente. Dopo l'aggiunta di 10^{-7} M di acido retinoico alla coltura, nei giorni successivi si verifica un pronunciato cambiamento morfologico. Entro 24 ore, le cellule si allontanano l'una dall'altra e le colonie diventano molto meno compatte (Figura 1B). Quindi la morfologia cellulare si altera gradualmente in molte colonie in cellule piatte triangolari con granuli citoplasmatici (Figure 1C e 1D). L'aspetto di queste cellule è sorprendentemente simile a quello delle cellule differenziate derivate consentendo alle cellule F9 di formare aggregati (Sherman et al.,

1976) e ricorda da vicino il presunto endoderma derivato dai corpi embrionali del teratocarcinoma (Martin e Evans, 1975). In condizioni standard, le cellule endodermiche parietali primarie di embrioni normali si attaccano al substrato ma non si diffondono e hanno una morfologia rifrangente.

Questi risultati hanno suggerito che le cellule endodermiche potrebbero accumularsi nelle colture dopo il trattamento con acido retinoico. Questa interpretazione è supportata da un esame dei marcatori biochimici che sono stati segnalati per distinguere l'endoderma dal carcinoma embrionale.

Produzione dell'attivatore del plasminogeno

Le cellule endodermiche sintetizzano e secernono l'attivatore del plasminogeno. [L'endoderma primitivo che insorge per primo nell'embriogenesi e l'endoderma parietale più differenziato dal concetto di metà gestazione secernono entrambi l'attivatore del plasminogeno, mentre l'endoderma viscerale differenziato non lo fa (Strickland et al., 1976). Per questo motivo, e poiché ogni distinzione più fine non è centrale in questo lavoro, il termine endoderma sarà usato per designare quelle cellule che producono l'attivatore del plasminogeno, implicando che esse sono primitive o parietali ma non viscerali.] Questa proprietà è stata dimostrata per la prima volta in colture primarie dell'endoderma parietale e in colture derivate da blastocisti e masse cellulari interne isolate (Strickland et al., 1976). È stato anche dimostrato che le cellule di carcinoma embrionale non secernono livelli apprezzabili di questo enzima, ma che le cellule endodermiche che si differenziano da queste cellule sì (Sherman et al., 1976; Topp et al., 1976; Linney e Levinson, 1977).

Inoltre, è stato riportato che la produzione di attivatore del plasminogeno da parte dell'endoderma derivato dal teratocarcinoma è aumentata dal trattamento delle cellule con reagenti che aumentano la concentrazione intracellulare di cAMP (Linney e Levinson, 1977). Abbiamo corroborato questo risultato utilizzando colture primarie di endoderma parietale. La tabella 1 dimostra che la produzione di proteasi da parte di queste cellule è aumentata di circa due volte dal trattamento con dibutiril cAMP (DbcAMP). Questo effetto non è dovuto all'attività mitogenica del DbcAMP poiché il numero di cellule nelle colture trattate e di controllo è equivalente. L'acido retinoico da solo o in combinazione con DbcAMP non ha alcun effetto sulla produzione di proteasi (Tabella 1).

Le cellule F9 cresciute in condizioni standard producono quantità molto basse di attivatore del plasminogeno. La quantità di enzima aumenta leggermente ma in modo riproducibile in queste colture all'aumentare della densità cellulare (Figura 2). L'aggiunta di acido retinoico alle colture, tuttavia, aumenta la secrezione dell'attivatore del plasminogeno di oltre 10 volte in 3 giorni di coltura (Figura 2). Va notato che l'effetto dell'acido retinoico sulla produzione di proteasi non è evidente fino a circa 48 ore di trattamento; quindi i cambiamenti nella morfologia (Figura 1) e nella secrezione enzimatica sono approssimativamente paralleli nel tempo.

Alla luce dell'effetto del cAMP sull'endoderma sopra descritto, era interessante esaminare la sensibilità delle colture al cAMP. DbcAMP da solo ha scarso effetto sulle colture F9: DbcAMP e acido retinoico presi insieme, tuttavia, hanno un apparente effetto sinergico sulla secrezione di proteasi (Figura 2). L'azione di DbcAMP nelle colture trattate con acido retinoico non è immediata ma richiede diversi giorni per manifestarsi.

Pertanto, utilizzando la morfologia, la produzione di attivatore del plasminogeno e la sensibilità a DbcAMP come criteri per l'identificazione, il tipo di cellula generato dal trattamento delle cellule F9 con acido retinoico è simile all'endoderma. Le seguenti osservazioni sperimentali sono rilevanti per l'interpretazione di questi risultati:

- Nessuno degli effetti descritti può essere spiegato sulla base della proliferazione cellulare, cioè della tossicità selettiva con conseguente arricchimento delle cellule differenziate. La Figura 3 dimostra che il tasso di crescita è essenzialmente identico nelle colture di controllo e in quelle trattate con acido retinoico, DbcAMP o entrambi.
- L'aumentata attività proteolitica non è dovuta al rilascio di proteasi lisosomiali. Come mostrato

nella Tabella 2, un'analisi di enzimi lisosomiali rappresentativi (ad esempio, N-acetil-p-glucosaminidasi) presenti a livello intracellulare o rilasciati nel mezzo non rivela alcuna differenza tra le colture di controllo e quelle trattate con acido retinoico.

- L'enzima prodotto nelle colture trattate con acido retinoico è simile nelle proprietà generali ad altri attivatori del plasminogeno. L'attività fibrinolitica del mezzo condizionato dipende completamente dalla presenza di plasminogeno nel saggio e il mezzo condizionato è quantitativamente inibito dal diisopropil-fluorofosfato (dati non mostrati).

- Il trattamento delle cellule con acido retinoico da solo o in combinazione con DbcAMP determina un aumento intracellulare dell'attivatore del plasminogeno che è parallelo all'aumentata secrezione di questo enzima (Tabella 3). Questo risultato indica che questi composti non aumentano semplicemente la secrezione dell'attivatore plasminogeno precedentemente formato ma inducono e stimolano la produzione di enzima attivo.

- Sia l'effetto dell'acido retinoico sulle cellule F9 che l'effetto di DbcAMP sulle cellule F9 trattate con acido retinoico sono dose-dipendenti. L'acido retinoico in concentrazioni fino a 10^{-9} M determina differenze nei livelli di attivatore del plasminogeno rispetto alle colture di controllo. La molecola è sempre più efficace man mano che la concentrazione sale a 10^{-6} M; al di sopra di questa quantità è tossico (Figura 4). A tutte le concentrazioni di acido retinoico, le colture possono essere stimolate da DbcAMP per aumentare la secrezione dell'attivatore del plasminogeno, il che suggerisce che le due molecole non agiscono attraverso lo stesso percorso per stimolare la produzione di enzimi. L'effetto di DbcAMP sulle colture trattate con acido retinoico è rilevabile a 10^{-4} M.

- Le caratteristiche strutturali delle molecole dell'acido retinoico perché quest'ultimo sia efficace sono rigorose. La Figura 5 illustra che la modifica della funzione acida al carbonio-15 mediante riduzione ad aldeide o alcool diminuisce l'efficacia della molecola di circa 1000 volte. Al contrario, l'analogo trimetilmossifenile dell'acido retinoico (TMMP), in cui il sistema dell'anello 5,6 cicloesenilico è stato sostituito con un anello aromatico, conserva un'attività sostanziale. In linea con l'importanza della funzione dell'acido carbossilico suggerita sopra, la conversione dell'acido TMMP nell'estere etilico o nell'ammide sostituita ne abolisce completamente l'attività.

- L'effetto di DbcAMP sulle colture trattate con acido retinoico è dovuto alla sua attività come cAMP. La Figura 6 mostra che altri mezzi per aumentare il livello intracellulare di cAMP, ad esempio l'aggiunta di tossina colerica o l'inibitore della fosfodiesterasi ciclica metil-isobutilxantina, hanno effetti simili a DbcAMP. La tossina del colera ha precedentemente dimostrato di aumentare la sintesi dell'attivatore del plasminogeno da parte delle cellule endodermiche derivate dal teratocarcinoma (Linney e Levinson, 1977) e colpisce le colture primarie dell'endoderma parietale in modo simile (dati non mostrati). Poiché il butirrato è un contaminante comune delle preparazioni di DbcAMP e anche un potente induttore della differenziazione cellulare dell'eritroleucemia (Leder e Leder, 1975), è interessante che questo composto non abbia alcun effetto (vedi sotto).

- L'acido retinoico aumenta la percentuale di colonie che secernono l'attivatore del plasminogeno da < 10% a quasi il 100% (Tabella 4). Quindi questo composto non sta semplicemente inducendo un piccolo numero di cellule nella popolazione a produrre grandi quantità di enzima. Stimiamo, sulla base dei dati nella Tabella 4 e della dimensione media della colonia al momento del test (circa 5 cellule), che un minimo di circa il 20% delle cellule si stia differenziando (questa stima presuppone solo una cellula attiva per colonia). Una misura più diretta della percentuale di cellule differenziate può essere ottenuta ripiastrando le cellule di controllo o trattate a bassa densità e determinando il numero di cellule che producono l'attivatore del plasminogeno mediante la sovrapposizione di fibrina-agar. I dati ottenuti in questo modo suggeriscono che la percentuale nelle cellule di controllo è molto bassa (~1%) e che un trattamento di 24 ore con acido retinoico aumenta questo numero a circa il 2,5% e un trattamento di 48 ore a circa il 15%. Non si conosce ancora la massima differenziazione ottenibile con un trattamento prolungato.

- L'effetto di DbcAMP non richiede la presenza continua di acido retinoico. La tabella 5 mostra che quando le colture vengono trattate prima con acido retinoico, lavate bene e quindi trattate con DbcAMP, le cellule secernono molto più attivatore del plasminogeno rispetto a quando vengono incubate con acido retinoico seguito da terreno di controllo. Questo risultato sarebbe previsto dalla proposizione che l'acido retinoico effettua una transizione delle cellule di carcinoma embrionale in un tipo di cellula con un fenotipo stabile, cioè una risposta al dibutiril cAMP. Questa scoperta è anche coerente con il modello temporale di stimolazione (Figura 2); l'azione del dibutiril cAMP non è significativa fino a quando l'acido retinoico non ha indotto l'accumulo di cellule differenziate sufficienti.

- La migrazione in un gel di sodio dodecilsolfato-poliacrilammide (SDS-PAGE) dell'attivatore del plasminogeno da colture F9 trattate con acido retinoico è molto simile a quella delle colture di endoderma parietale (Figura 7). Le stime del peso molecolare apparente dalla Figura 7 danno un valore di 79.000 dalton per l'enzima dell'endoderma parietale e di 78.000 dalton per l'enzima indotto dall'acido retinoico. Il trofoblasto, un altro tipo cellulare dell'embrione precoce del topo che secreta l'attivatore del plasminogeno, produce un enzima con un peso molecolare apparente di 42.000 dalton (S. Strickland, osservazione non pubblicata).

Sintesi di proteine simili al collagene

Le cellule dell'endoderma parietale sintetizzano, in vivo (Pierce et al., 1962) e in vitro (Clark et al., 1975b), una spessa membrana basale, la membrana di Reichert, che è noto contenere tra il 20 e il 50% di collagene nel ratto (Clark et al., 1975a). Per questo motivo, abbiamo esaminato colture F9 in presenza e in assenza di acido retinoico per la sintesi di proteine simili al collagene. La Figura 8 mostra autoradiogrammi SDS-PAGE derivati da colture che erano state marcate metabolicamente con prolina C¹⁴ e da fluidi di incubazione da queste colture. È chiaro che il trattamento con acido retinoico si traduce in autoradiogrammi in cui due bande sono sostanzialmente aumentate (freccia; confrontare la corsia 6 con la corsia A); queste due bande sono vicine sul gel con un peso molecolare apparente di 165.000 dalton. Quando tali colture radiomarcate vengono incubate in un piccolo volume di PBS, molte delle proteine possono essere rilevate nel fluido di incubazione (corsia a), comprese le due bande indotte dall'acido retinoico (corsia b). Ciò suggerisce che le proteine responsabili del doppietto siano secrete. Inoltre, queste proteine vengono digerite da una collagenasi priva di proteasi in condizioni in cui il resto delle proteine rimane sostanzialmente invariato (confrontare la corsia d, con collagenasi, con la corsia b, senza). In esperimenti separati (non mostrati), è stato anche dimostrato che le cellule dell'endoderma parietale sintetizzano e secernono proteine che migrano come un doppietto a 165.000 dalton; queste proteine erano anche sensibili alla digestione della collagenasi.

Fosfatasi alcalina

È stato suggerito che la diminuzione dell'attività specifica della fosfatasi alcalina può servire come indicatore della differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale. Sebbene manchi una solida giustificazione sperimentale per questo concetto (vedi Discussione), abbiamo esaminato il contenuto di fosfatasi alcalina delle colture F9 in condizioni variabili. La Tabella 6 mostra che vi è un aumento di 20 volte nell'attività specifica della fosfatasi alcalina nelle colture di controllo in tre giorni di crescita. Usando gli altri criteri di differenziazione sopra menzionati, in queste colture si verificava una differenziazione estremamente limitata. La presenza di acido retinoico determina un aumento di circa 2 volte nelle cellule trattate quando misurata a 1, 2 o 3 giorni dopo la placcatura. Va notato che, contrariamente all'effetto sui livelli dell'attivatore del plasminogeno, una combinazione di acido retinoico e DbcAMP non ha un apparente effetto sinergico sui livelli di fosfatasi alcalina.

Altre osservazioni

Le linee cellulari mantenute in vitro spesso subiscono cambiamenti fenotipici e genotipici con la conseguenza che alla fine le cellule hanno poca somiglianza con la popolazione di partenza. Per questo motivo, le cellule F9 utilizzate in questi esperimenti sono state iniettate per via sottocutanea nei topi, il tumore risultante è stato asportato due settimane dopo ed è stata stabilita una coltura da questo tumore. Tutti i risultati presentati sopra potrebbero essere riprodotti quantitativamente utilizzando questo nuovo isolato di cellule F9.

Per testare la generalità della risposta delle cellule di carcinoma embrionale all'acido retinoico, la linea cellulare PCC4.aza 1 è stata testata in modo identico a quello descritto per le cellule F9 nella Figura 2. L'acido retinoico era tossico per le cellule a concentrazioni $>10^{-8}$ M. A 3×10^{-9} M e al di sotto, non è stato osservato alcun aumento dell'attivatore del plasminogeno durante tre giorni di coltura. Poiché il primo tipo di cellula a differenziarsi dalle cellule di carcinoma embrionale PCCX.aza 1 ha una morfologia fibroblastica (Sherman, 1975) piuttosto che l'aspetto epiteliale dell'endoderma, è possibile che si stia verificando la differenziazione, ma le cellule prodotte non secernono proteasi.

Abbiamo anche testato altri composti per il loro effetto sulle cellule F9. I più notevoli di questi sono i seguenti. Altre vitamine liposolubili come la vitamina E, la vitamina K e la vitamina D non hanno avuto alcun effetto. Anche steroidi come progesterone, estradiolo e diidrotestosterone erano inattivi. I composti noti per aumentare l'attivatore del plasminogeno in altri tipi di cellule, come il forbole miristato acetato e le prostaglandine, non hanno avuto alcun effetto. Le molecole che inducono la differenziazione nelle cellule infettate dal virus Friend, come il butirato, il dimetilsolfossido e l'esametilene bis-acetammide, erano tossiche per le cellule F9 alla concentrazione raccomandata per le cellule eritroleucemiche e non erano efficaci a concentrazioni inferiori.

Infine, sebbene il peso molecolare dell'attivatore del plasminogeno prodotto (Figura 7) e la morfologia cellulare (Figura 1) rendessero improbabile che l'acido retinoico stesse inducendo la formazione del trofoblasto, abbiamo anche analizzato le colture per la presenza di un enzima, coinvolto nella biosintesi del progesterone ed è caratteristico delle cellule del trofoblasto (Marcal et al., 1975), che non è stato rilevato nelle colture F9 sottoposte ai trattamenti descritti in questo rapporto.

Discussione

I dati qui presentati sono coerenti con l'interpretazione secondo cui le cellule di carcinoma embrionale F9 possono essere indotte dall'acido retinoico a differenziarsi in endoderma.

Chiaramente, ulteriori esami (ad esempio, l'analisi ultrastrutturale) dovrebbero essere eseguiti per verificare questa conclusione provvisoria. Con questa riserva in mente, i risultati dovrebbero essere considerati da diversi punti di vista: primo, un'analisi delle prove biochimiche che sta avvenendo la differenziazione in endoderma; secondo, le implicazioni per il controllo dello sviluppo; e terzo, il rapporto di conoscenze precedenti riguardanti l'acido retinoico.

Diverse linee di evidenza implicano che il tipo cellulare che si accumula nelle colture F9 trattate con acido retinoico sia l'endoderma. Le somiglianze tra questo tipo cellulare e l'endoderma "nativo" sono: la produzione dell'attivatore del plasminogeno, il peso molecolare apparente della proteasi, la sensibilità della produzione di enzimi a livelli elevati di cAMP e la sintesi e la secrezione di una proteina simile al collagene. L'osservazione che il trattamento delle cellule F9 con acido retinoico aumenta l'attività specifica della fosfatasi alcalina è in contrasto con il concetto che la differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale si traduce invariabilmente in una diminuzione della fosfatasi alcalina. Tuttavia, il fondamento sperimentale di questo concetto richiede un attento esame.

Le cellule di carcinoma embrionale hanno livelli elevati di fosfatasi alcalina (Damjanov, Solter e

Skreb, 1971; Bernstine et al., 1973). Le cellule endodermiche che circondano le cellule del carcinoma embrionale nei corpi embrionali sono state inizialmente segnalate come prive di fosfatasi alcalina rilevabile istochimicamente (Bernstine et al., 1973; Martin and Evans, 1975); lavori recenti, tuttavia, hanno rilevato questo enzima nelle cellule endodermiche utilizzando preparazioni non fissate e hanno suggerito che la mancanza di attività enzimatica precedentemente notata potrebbe essere dovuta alla procedura di fissazione (Wada et al., 1976). Inoltre, l'analisi dei dati di Bernstine et al. (1973) su diverse linee cellulari di teratocarcinoma non indica alcuna correlazione tra la capacità di differenziare e il livello di fosfatasi alcalina.

L'analisi biochimica degli estratti di cellule endodermiche parietali ha dimostrato che queste cellule hanno livelli di fosfatasi alcalina inferiori rispetto alle cellule di carcinoma embrionale (dati non mostrati). Queste cellule, tuttavia, derivano dal tessuto di metà gestazione e rappresentano quindi un endoderma differenziato; potrebbero esserci differenze significative tra l'endoderma parietale e l'endoderma primitivo poiché si differenzia per la prima volta dalle cellule precursori.

Pertanto il concetto che un'immediata diminuzione del contenuto di fosfatasi alcalina debba accompagnare la differenziazione del carcinoma embrionale in endoderma appare discutibile, e quindi l'effetto dell'acido retinoico sui livelli di questo enzima nelle colture F9 non contraddice necessariamente le conclusioni raggiunte utilizzando altri criteri. Va detto che i risultati qui presentati supportano conclusioni precedenti (Sherman et al., 1976) secondo cui un basso livello di differenziazione si verifica spontaneamente nelle colture F9. Ad esempio, i livelli di attivatore del plasminogeno aumentano leggermente all'aumentare della densità cellulare nelle colture non trattate (Figura 4); sono presenti cellule con morfologia endodermica; e le colture non trattate mostrano una risposta bassa ma variabile a DbcAMP (Figura 4).

Un concetto prevalente nell'embriogenesi dei mammiferi è che la posizione delle cellule staminali determina, in larga misura, il percorso differenziativo finale in cui le cellule procederanno (Tarkowski e Wroblewska, 1967). Questa idea è supportata da studi sulla differenziazione cellulare del teratocarcinoma poiché la formazione di aggregati tridimensionali sembra essere un modo per indurre lo sviluppo di cellule di carcinoma embrionale in vitro (Martin e Evans, 1975). L'effetto dell'acido retinoico sulle cellule F9, pur non sminuendo in alcun modo l'ipotesi posizionale, suggerisce che, dati gli stimoli chimici corretti, la topografia non è un prerequisito necessario. Con questo in mente, dovrebbe essere interessante determinare se l'acido retinoico influenza anche la blastocisti o lo sviluppo della massa cellulare interna in vitro, o se altri composti fisiologicamente importanti possono esercitare un effetto sulla differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale.

Sono stati sviluppati diversi sistemi in vitro in cui è possibile studiare l'attività biologica dei composti retinoidi. Questi sono la prevenzione della metaplasia squamosa nelle colture di organi della prostata di topo (Lasnitzki, 1962) e della trachea di criceto (Clamon et al., 1974) e un aumento del contenuto di RNA cellulare nella coltura di cellule epidermiche di topo (Sporn, Dunlop e Yuspa, 1973). La risposta dei fibroblasti dell'embrione di pollo (Wilson e Reich, 1978) e delle cellule F9 all'acido retinoico fornisce due ulteriori tipi di cellule in cui è possibile testare i derivati della vitamina A.

Va notato che sebbene il risultato finale della stimolazione dell'acido retinoico delle cellule F9 e dei fibroblasti dell'embrione di pollo sia lo stesso (ovvero, aumento della produzione di attivatore del plasminogeno), la natura della risposta è molto diversa. Nei fibroblasti le cellule rispondono in poche ore sintetizzando livelli elevati di proteasi e la presenza di acido retinoico è necessaria per una maggiore produzione di proteasi, mentre le cellule F9 rispondono nel giro di giorni per produrre cellule progenie che producono questo enzima in modo costitutivo.

L'influenza dell'acido retinoico sulla differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale è notevole per il fatto che la vitamina A è coinvolta nella differenziazione da oltre cinquant'anni (Wolbach e Howe, 1925; Yuspa e Harris, 1974). L'interesse per i retinoidi è stato accresciuto anche

dal suggerimento che questi composti potrebbero rivelarsi utili nella prevenzione di alcuni tumori epiteliali (Sporn et al., 1976). In precedenza, le indagini sulla regolazione della secrezione dell'attivatore del plasminogeno da parte di altri tipi di cellule hanno fatto luce sulle basi molecolari e sul controllo ormonale dell'ovulazione (Beers, Strickland e Reich, 1975; Strickland e Beers, 1976), impianto (Strickland et al., 1976) e infiammazione (Vassalli, Hamilton e Reich, 1976). Sembra quindi ragionevole suggerire che gli studi sulla transizione indotta chimicamente del carcinoma embrionale in altri tipi di cellule potrebbero fornire informazioni sui meccanismi coinvolti nella differenziazione e sul possibile ruolo dei derivati della vitamina A in questi meccanismi.