

Le cellule staminali

Potenzialità delle cellule

I nuclei delle cellule embrionali o di quelle adulte hanno un'espressione dei geni ristretta?

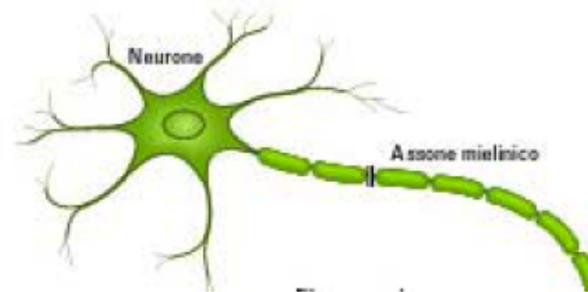
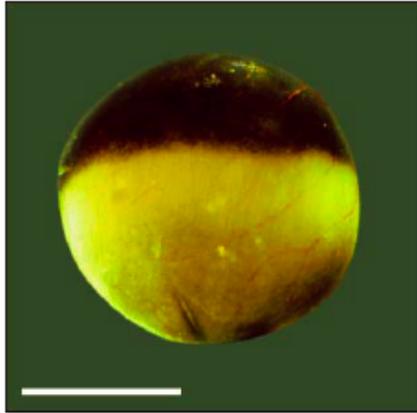
UNIPOTENTI

o sono capaci di esprimere tutti i geni necessari a costruire un organismo completo?

TOTIPOTENTI

E' possibile clonare un adulto a partire dal nucleo di una cellula somatica?

Totipotenza



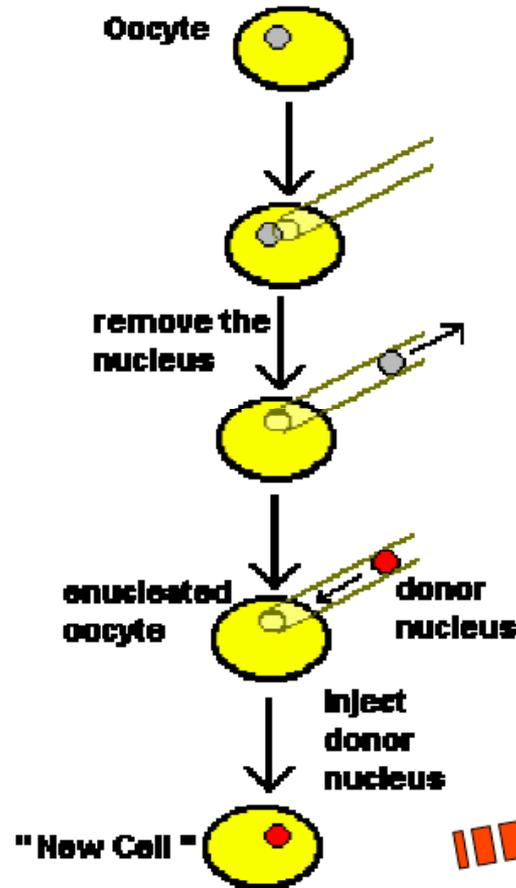
I geni sono identici in tutte le cellule

Tutte le cellule possono controllare lo sviluppo

Clonazione di un girino

Rana pipiens

Briggs and King (1952)



Il nucleo proviene da una cellula embrionale (blastula)



80%

Le cellule sono totipotenti

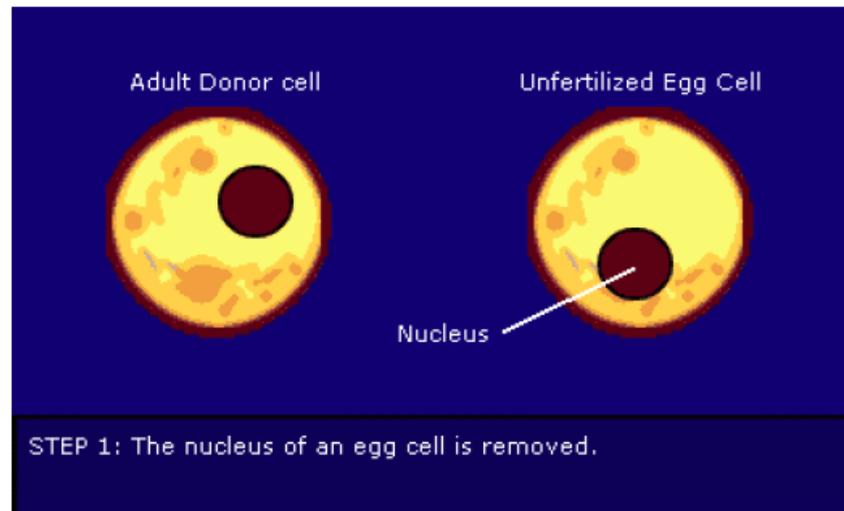


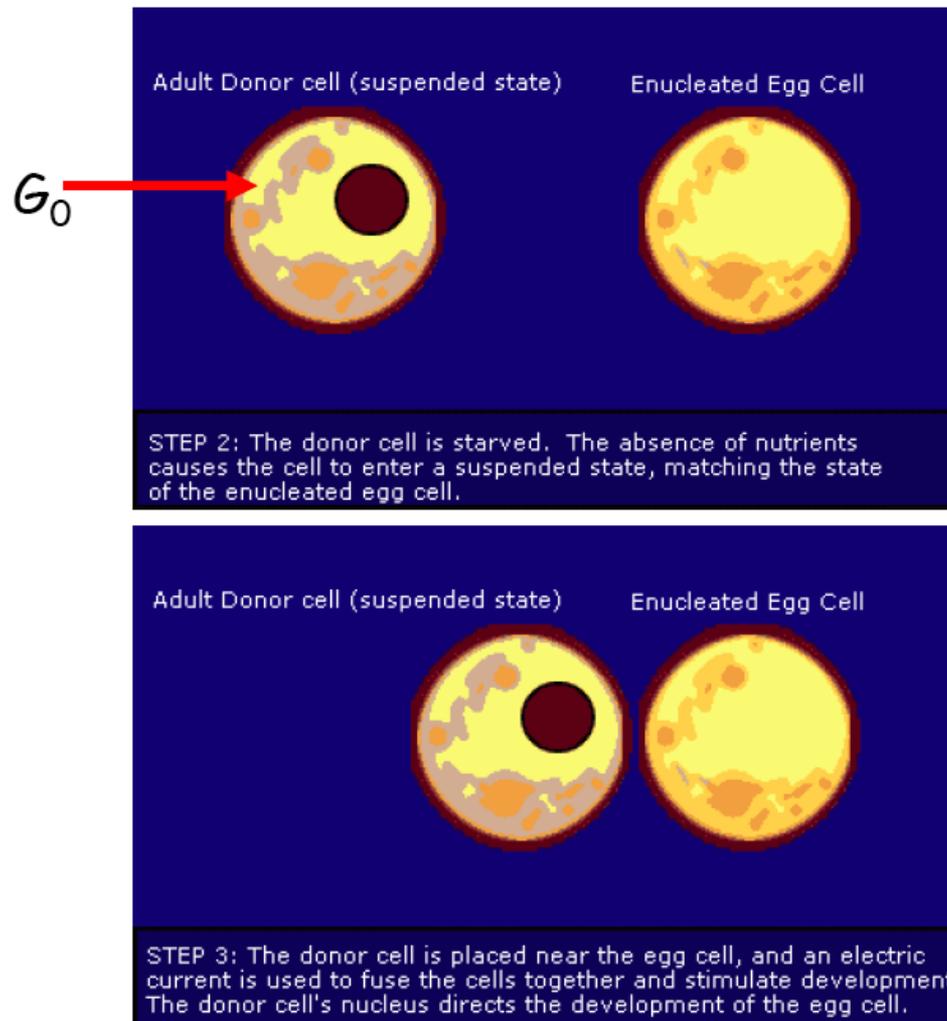
Sincronia del ciclo
cellulare nelle due
cellule

Il clonaggio di Dolly

Ian Wilmut and Keith Cambell

Nel 1995 si diede conferma della
possibilità di clonare i mammiferi,
partendo dal nucleo di una cellula
somatica presa da un adulto

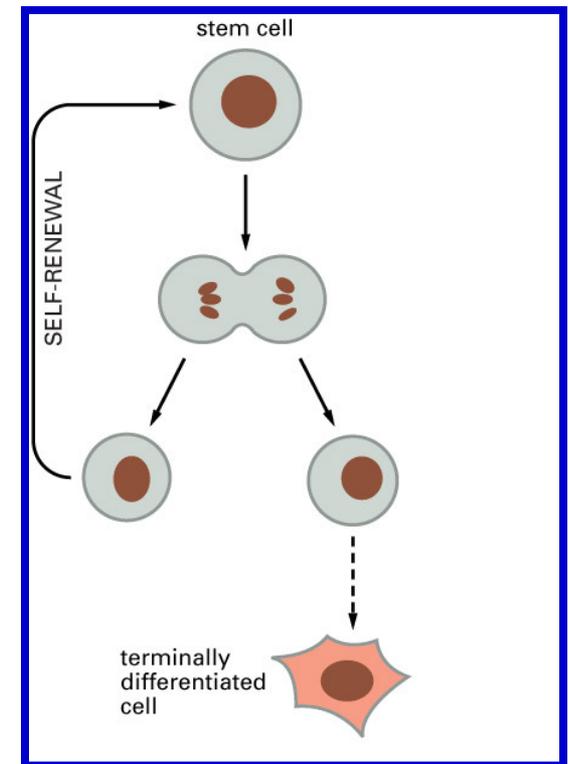




Quando il nucleo entra nel citoplasma, le proteine "ri-programmano" i cromosomi nel nucleo

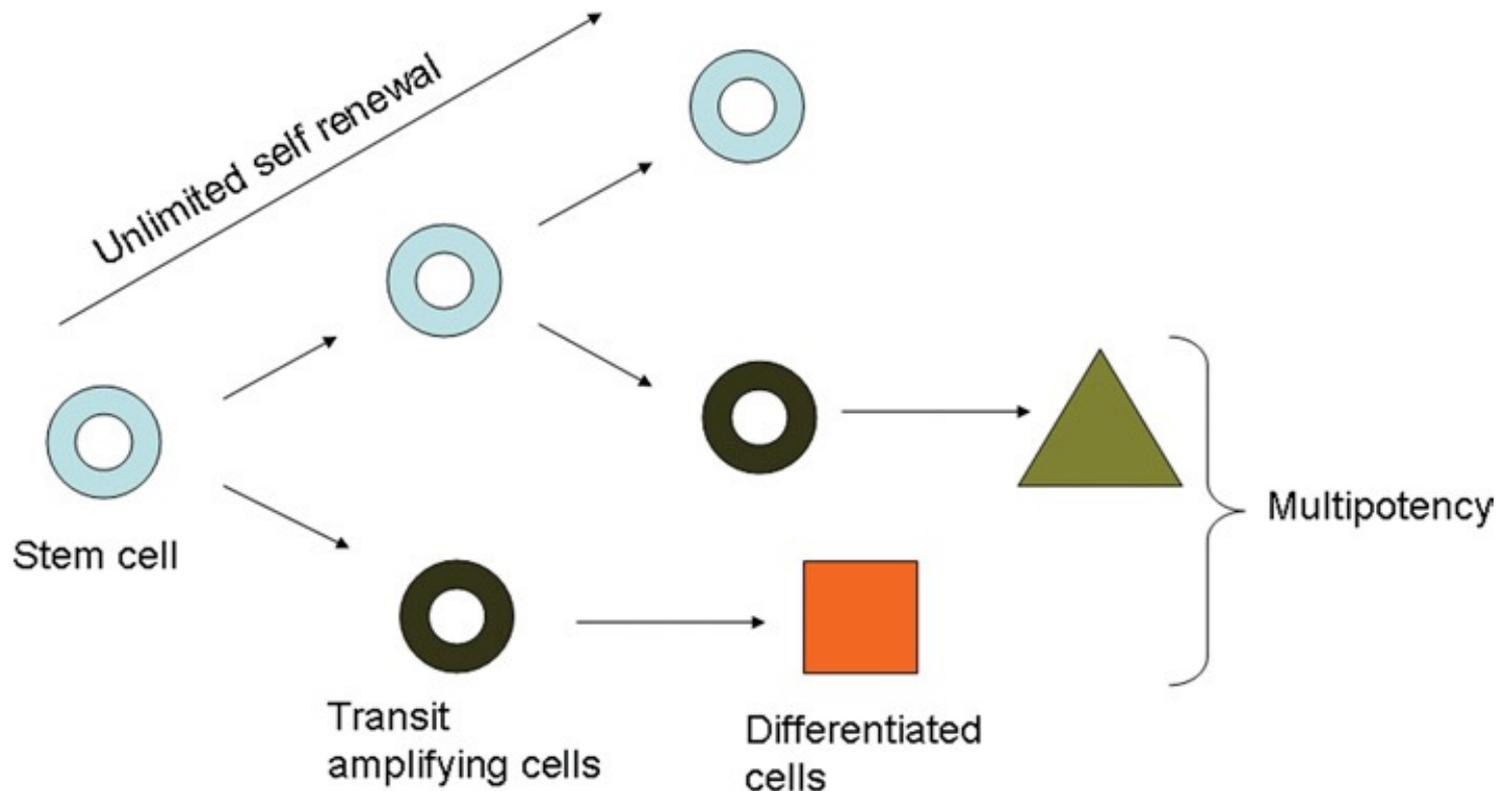
What are “stem cells”?

- Stem cells generate a mixture of progeny; some daughter cells remain undifferentiated (like their parent cells) and others differentiate.
- They are of many types: epidermal, intestinal, hematopoietic, etc.
- The defining properties of a stem cell are:
 - It is not terminally differentiated.
 - It can divide without limit.
 - When it divides, the daughter cell has a “choice”:
 - Remain a stem cell, or
 - Terminally differentiate.

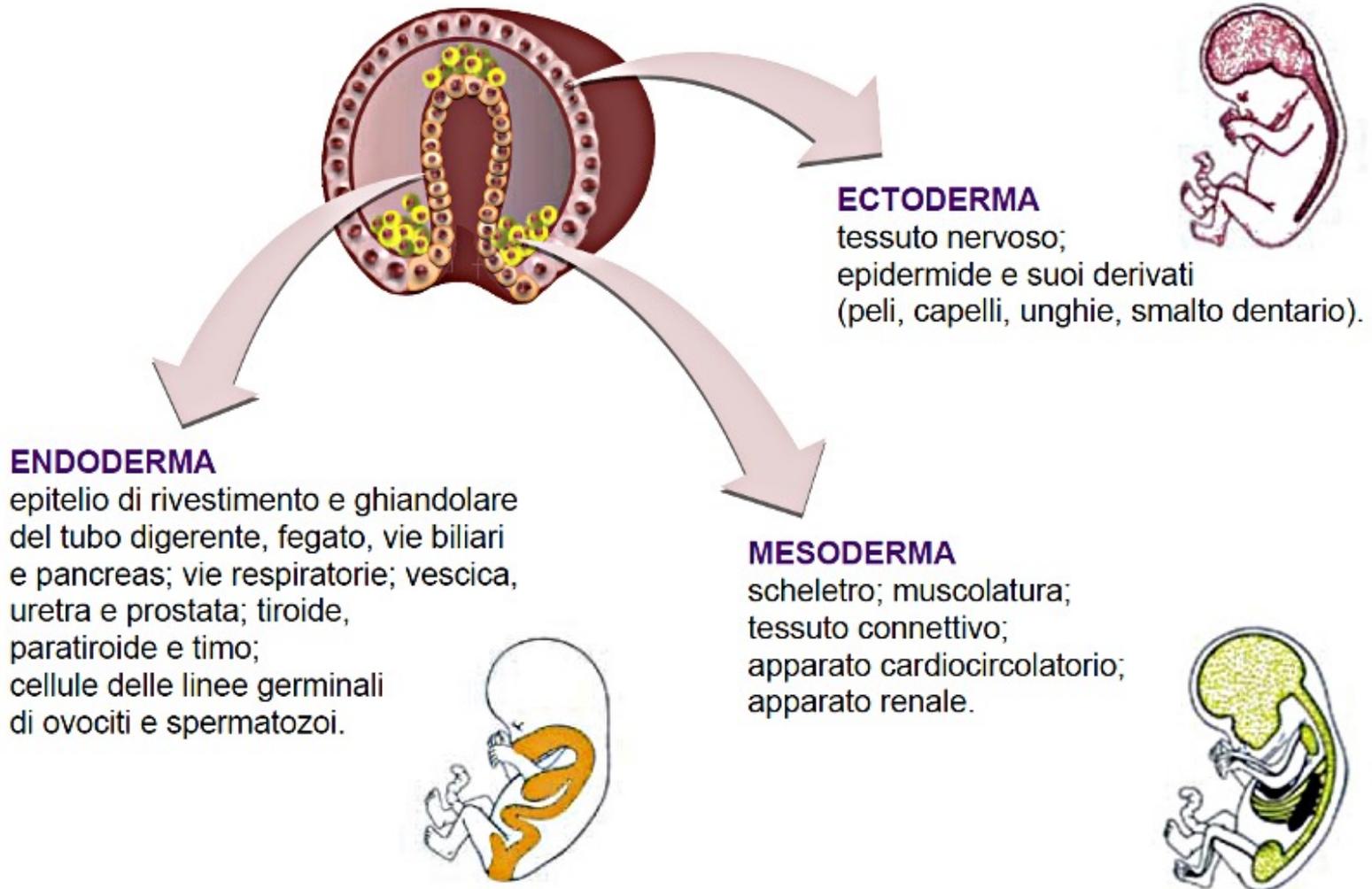


Stem Cells

Self-renewing, undifferentiated, multipotent cells



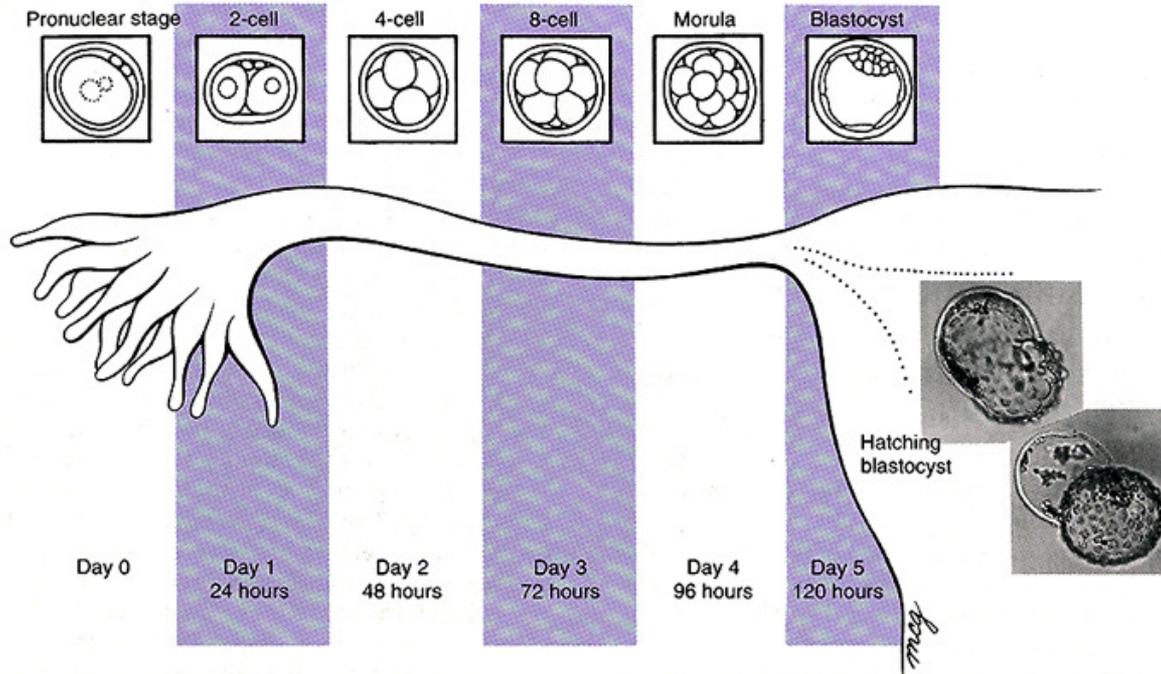
I tre foglietti embrionali



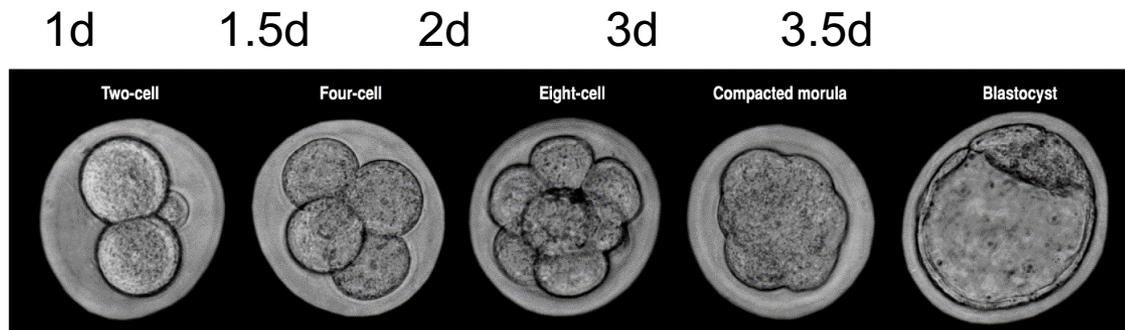
Definizioni – “potenzialità” delle cellule staminali

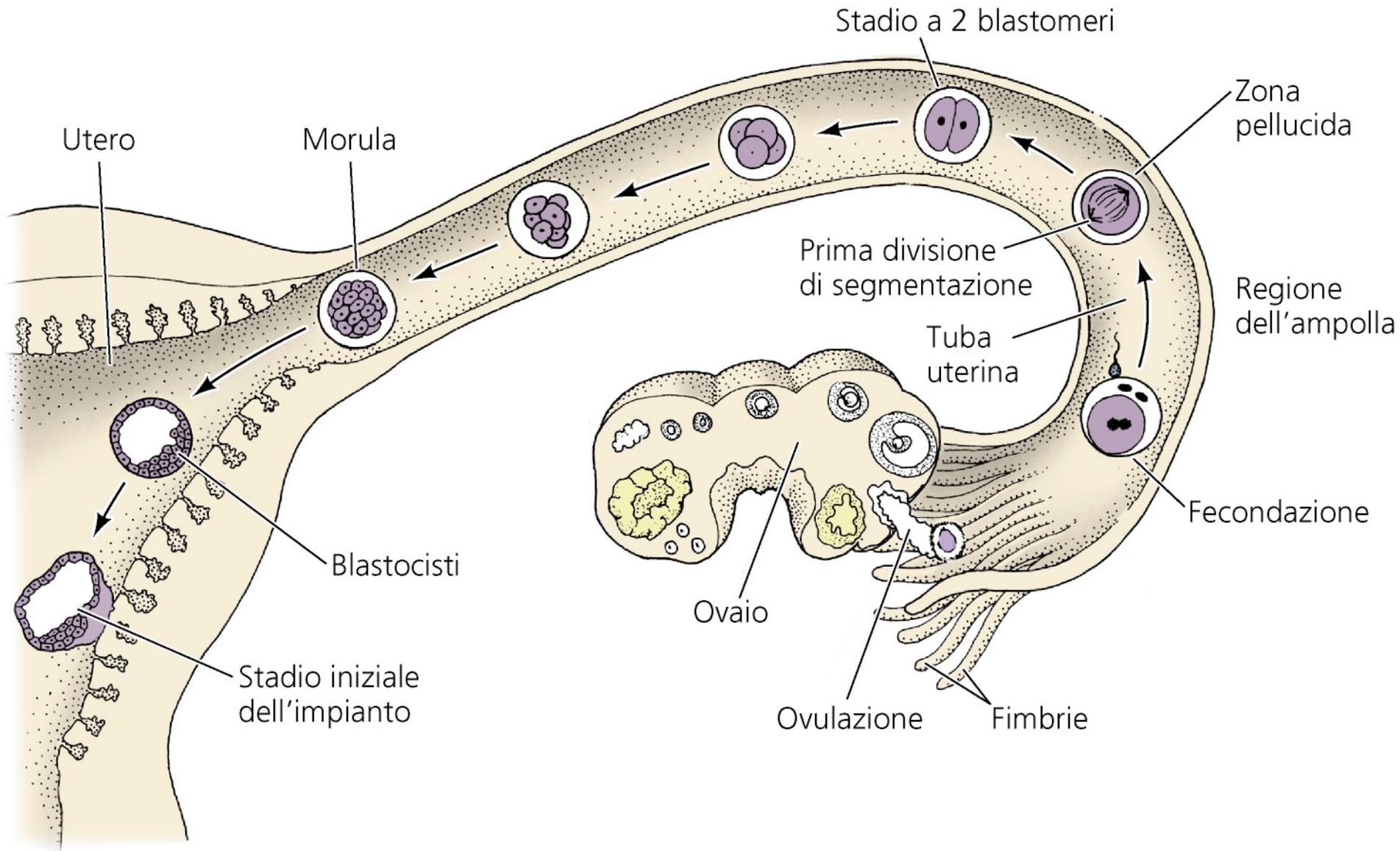
- Totipotente
 - Cellula che ha la potenzialità di generare tutte le cellule e tessuti che costituiscono l’embrione e nel caso dei mammiferi di supportarne lo sviluppo in utero.
- Pluripotente
 - Cellula che può dare origine alle cellule che derivano dai 3 foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma)
- Multipotente
 - Cellule specializzate che danno origine a cellule che hanno una determinata funzione (ie cellula staminale emopoietica)
- Unipotente
 - Cellula capace di differenziare a un solo tipo cellulare

UOMO

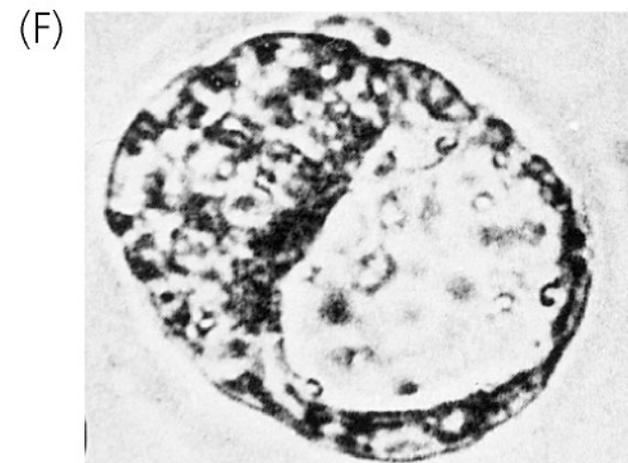
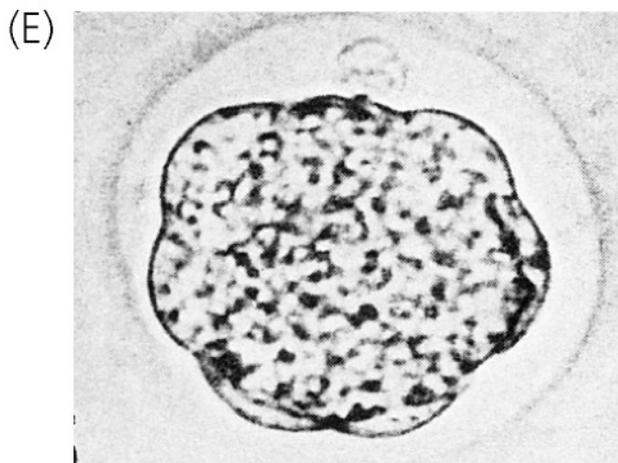
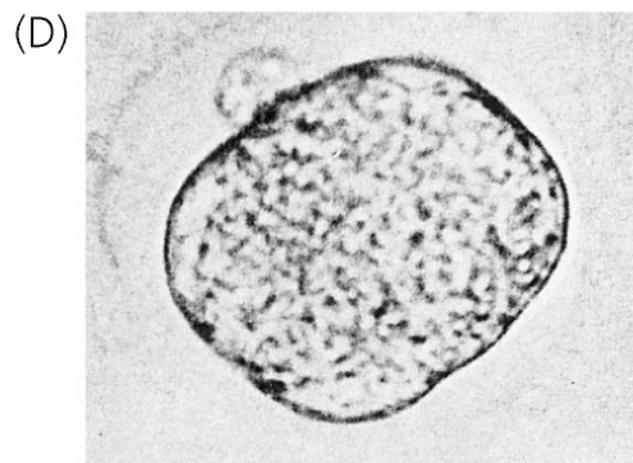
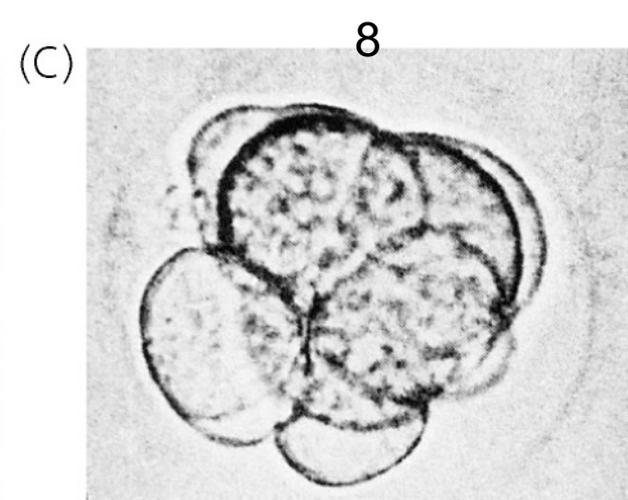
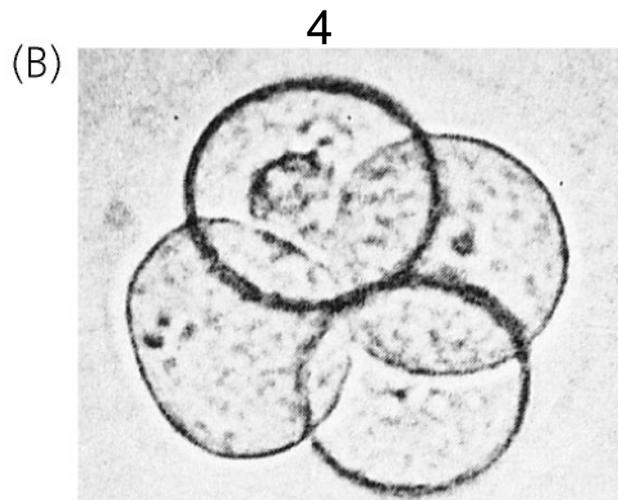
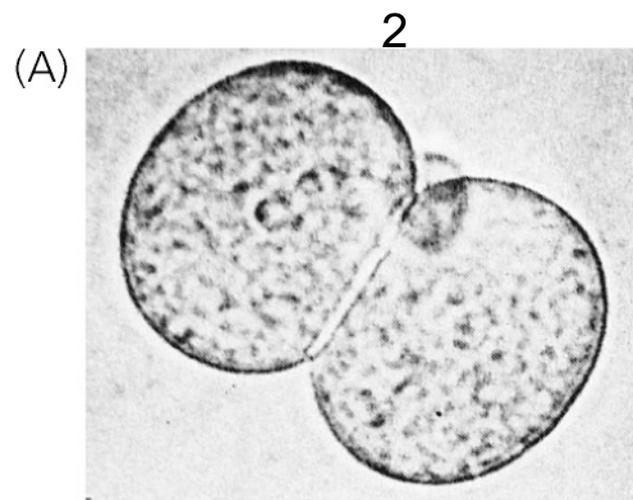


TOPO

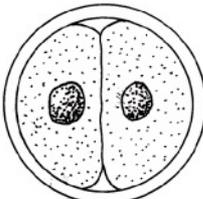
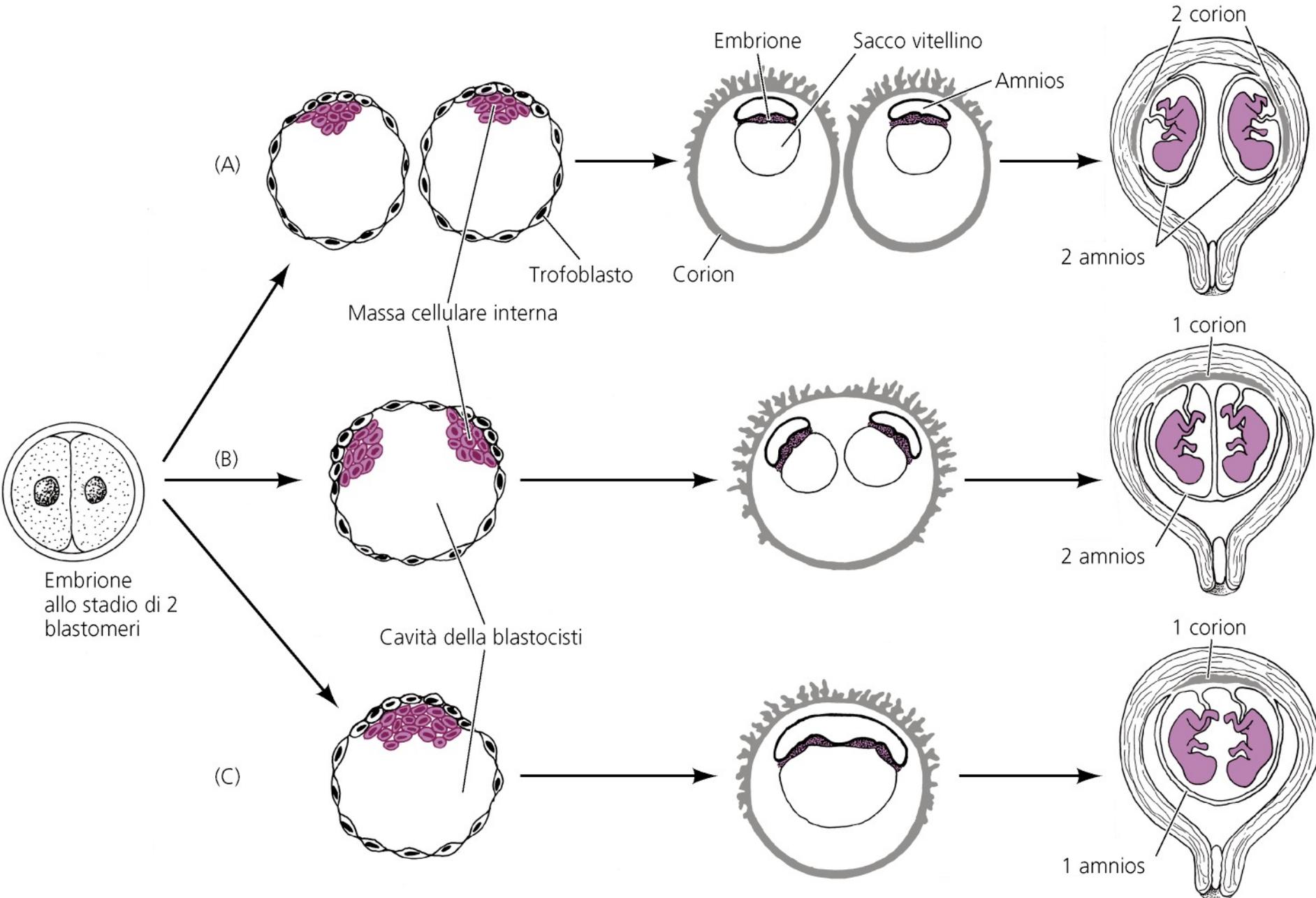




Formazione della morula e della blastocisti



- **Lo sviluppo precoce è regolativo:** una porzione dell'embrione può essere persa, e nonostante ciò lo sviluppo può andare avanti normalmente: ogni blastomero oppure ogni cellule della massa cellulare interna (ICM, inner cell mass) della blastocisti, può essere rimossa dall'embrione. Infatti nelle fasi di vita il rischio di insorgenza di difetti è molto basso.



(A)

(B)

(C)

Massa cellulare interna

Cavità della blastocisti

Embrione

Sacco vitellino

Amnios

Trofoblasto

Corion

2 amnios

2 corion

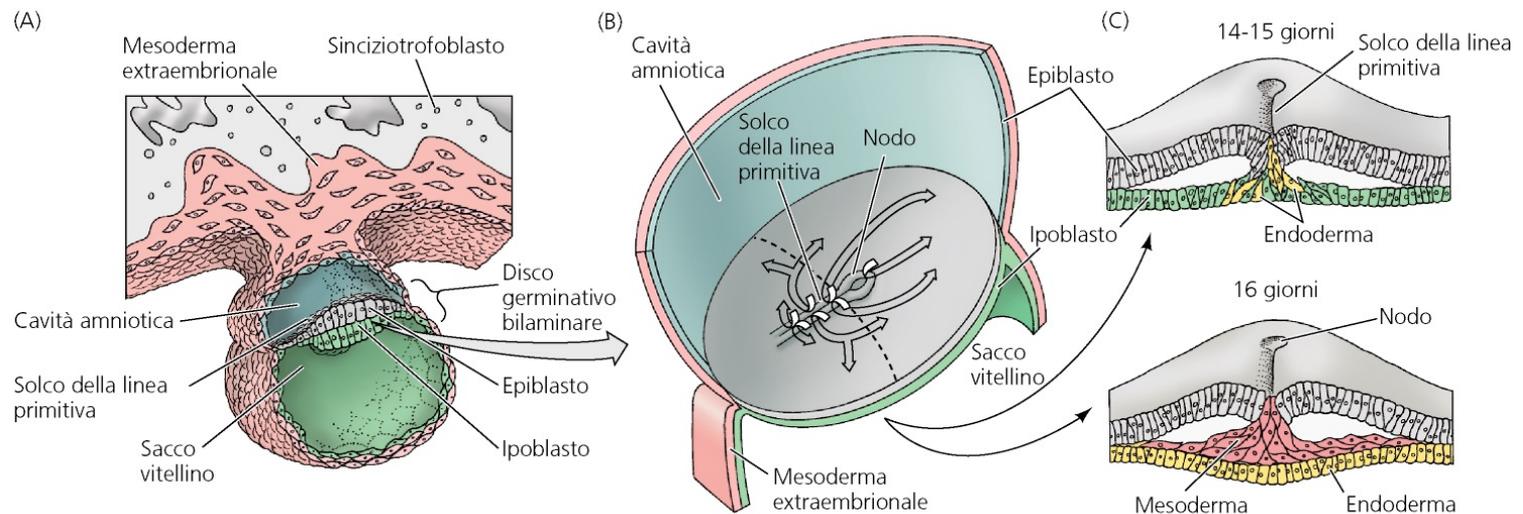
1 corion

2 amnios

1 corion

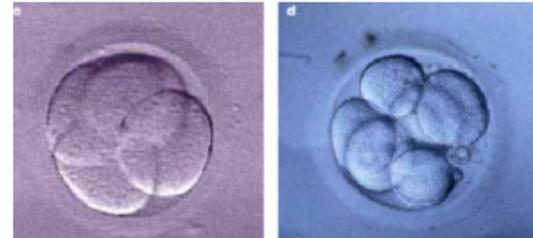
1 amnios

- Successivamente lo sviluppo è più **“a mosaico”** e il fato della cellula viene specificato indipendentemente dalla sua posizione.
- Se qualcosa è rimosso o distrutto non può essere sostituito e quello che rimane non può compensare.
- I danni **“teratogenici”** durante queste fasi di sviluppo causano effetti molto gravi.
- La gastrulazione è un evento critico che marca l'inizio del periodo dal quale l'embrione non può facilmente compensare perdite o danni, in quanto molti primordi di organi sono già allocati in poche cellule. L'organogenesi è molto sensibile a difetti.



CELLULE STAMINALI totipotenti

- Fino a **3-4 GIORNI DOPO FECONDAZIONE** nell'uomo
(zigote e blastomeri della morula) **Nel topo 2.5 giorni**
- può dare origine ad un individuo completo:
CAPACITÀ MORFOGENETICA
- illimitata capacità moltiplicativa e proliferativa:
IMMORTALITÀ CELLULARE
- può differenziarsi in tutti i tipi cellulari:
CAPACITÀ DIFFERENZIATIVA



CELLULE STAMINALI pluripotenti

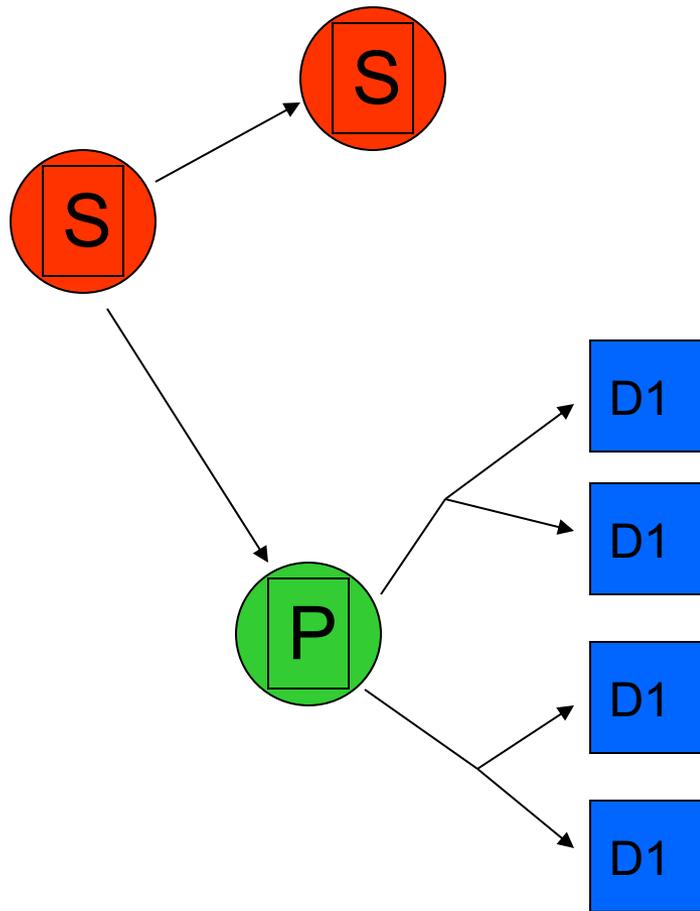
- da **4 a 6 GIORNI DALLA FECONDAZIONE** nell'uomo (cellule staminali **embrionali: blastocisti**) Nel topo 3.5 gg
- **NON PIU' CAPACE** di dare origine ad un individuo completo: capacità morfogenetica **PERDUTA**
- illimitata capacità moltiplicativa e proliferativa: **immortalità cellulare MANTENUTA**
- può differenziarsi in tutti i tipi cellulari: capacità differenziativa **MANTENUTA**



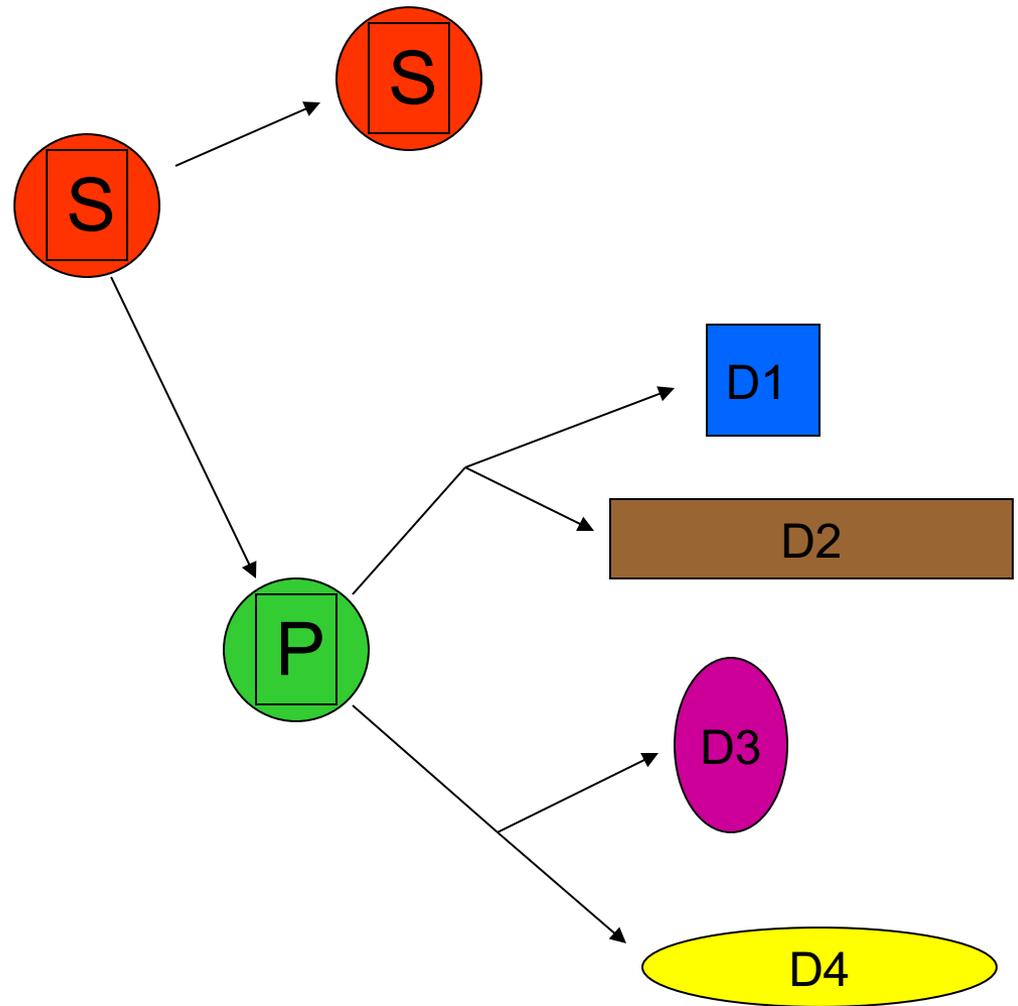
CELLULE STAMINALI multipotenti (adulte o somatiche)

- da ~**10** a **16 GIORNI DALLA FECONDAZIONE** (uomo)
(cellule staminali fetali, neonatali, del cordone, adulte)
Topo: da 4gg in poi)
- **NON PIU' CAPACE** di dare origine ad un individuo completo: capacità morfogenetica **PERDUTA**
- **NON PIU' CAPACE** di illimitata capacità moltiplicativa e proliferativa: immortalità cellulare **PERDUTA**
- può differenziarsi in tutti i tipi cellulari:
capacità differenziativa **MANTENUTA**

La pluripotenza delle cellule staminali



Unipotente

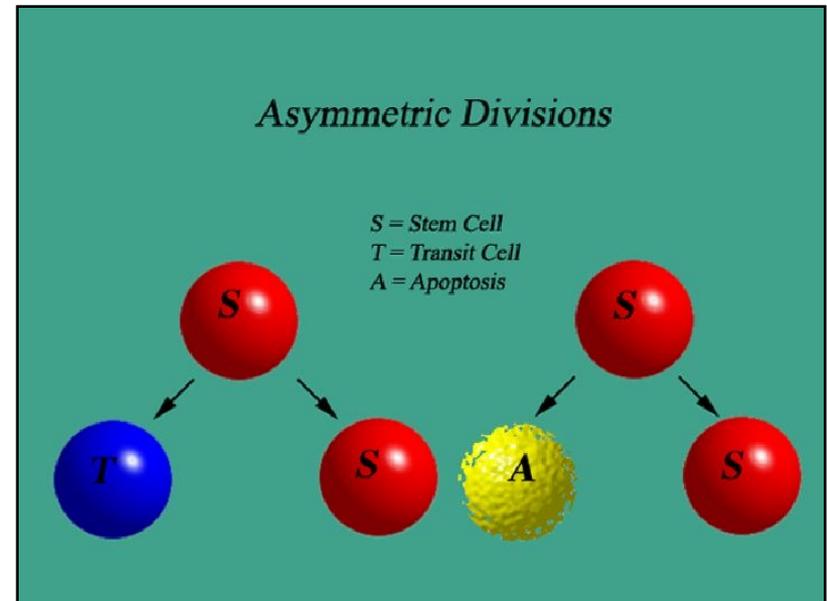


Pluripotente

DEFINIZIONE DI CELLULA STAMINALE IERI

ALBERS ET AL., 1990

- DI PER SE NON È DIFFERENZIATA IN MODO TERMINALE
- CAPACITÀ DI DIVIDERSI SENZA LIMITE
- LE CELLULE FIGLIE POSSONO SCEGLIERE TRA IL RIMANERE CELLULA STAMINALE O DIFFERENZIARE TERMINALMENTE



DEFINIZIONE DI CELLULA STAMINALE OGGI

➤ **STATIC A**

- **Cellula indifferenziata (non esprime marcatori specifici ne' una determinata morfologia)**
- **Capacita' di proliferazione**
- **Capacità di auto-mantenimento**
- **Capacità di generare progenie differenziata**

➤ **DiNAMIC A**

- **Può variare tipo di proliferazione e auto-mantenimento**
- **Flessibile nella capacità di differenziamento**
- **Sensibile a cambiamenti nell'omeostasi tissutale e rigenerazione**

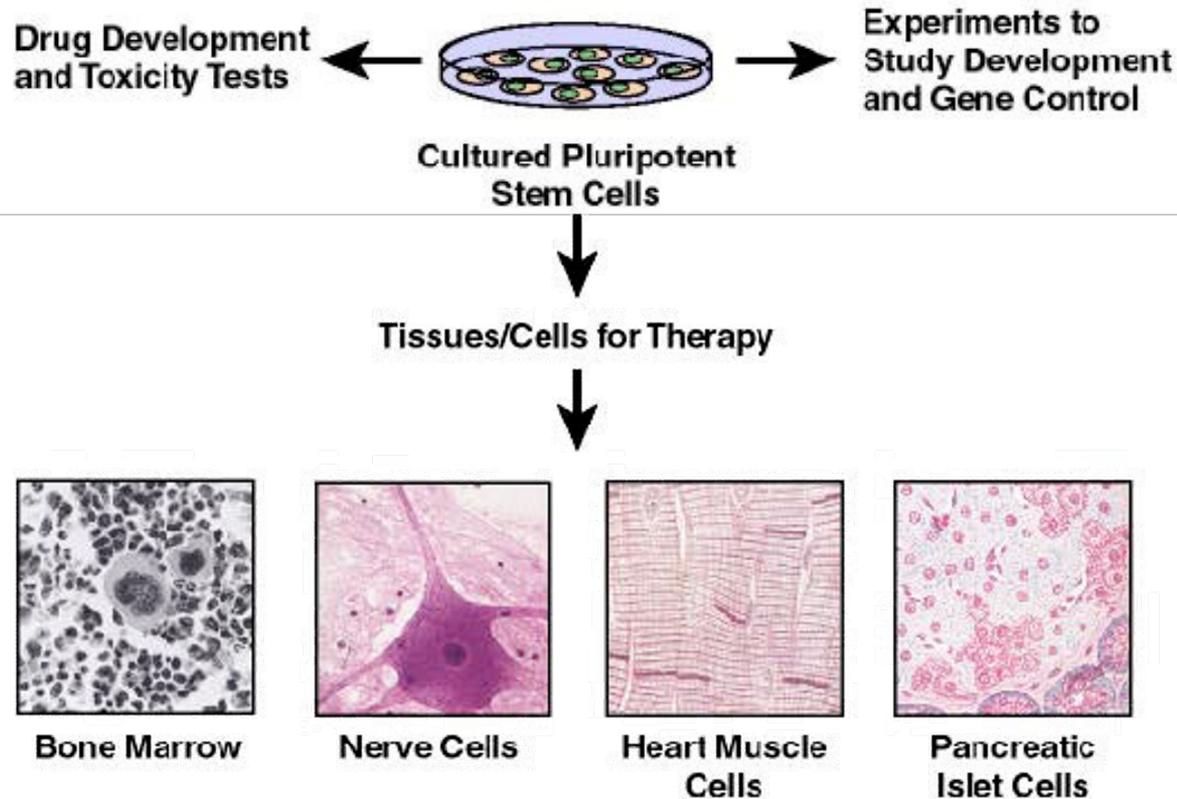
Perché studiare le cellule staminali?

Lo studio delle cellule staminali è molto importante per capire i meccanismi biologici di base e valutare l'efficacia e sicurezza di nuovi farmaci

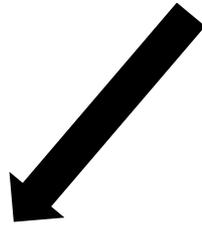
La ricerca sulle cellule staminali potrebbe condurre a terapie utilizzabili nel trattamento di malattie

Queste terapie potrebbero includere la sostituzione dei neuroni dopaminergici distrutti nel Parkinson, il trapianto di cellule pancreatiche beta producenti insulina nei pazienti diabetici, il trapianto di cellule muscolari cardiache nel cuore di pazienti infartuati, etc etc

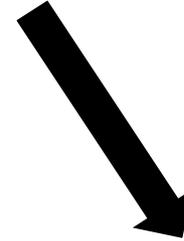
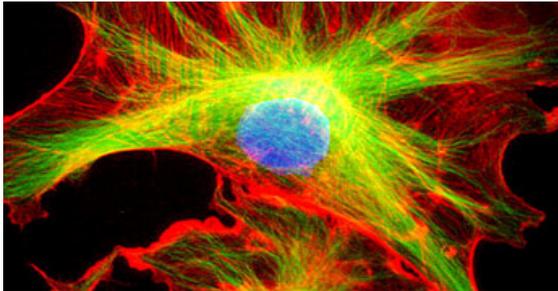
The Promise of Stem Cell Research



Regenerative Medicine



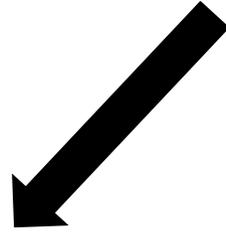
Cell Therapy



Tissue Engineering



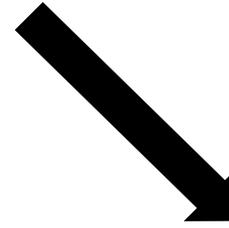
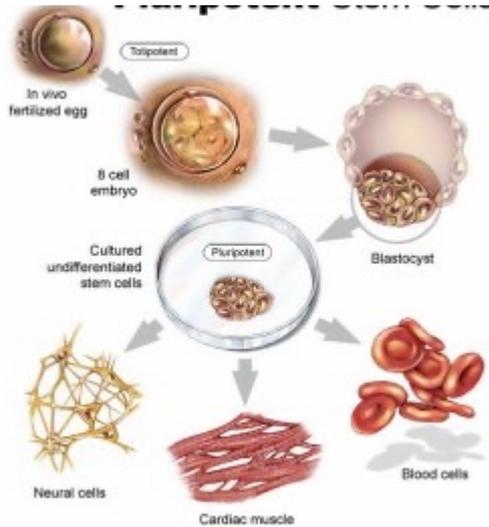
Stem Cells



Embryonic Stem Cells

Derived from embryonic blastocysts

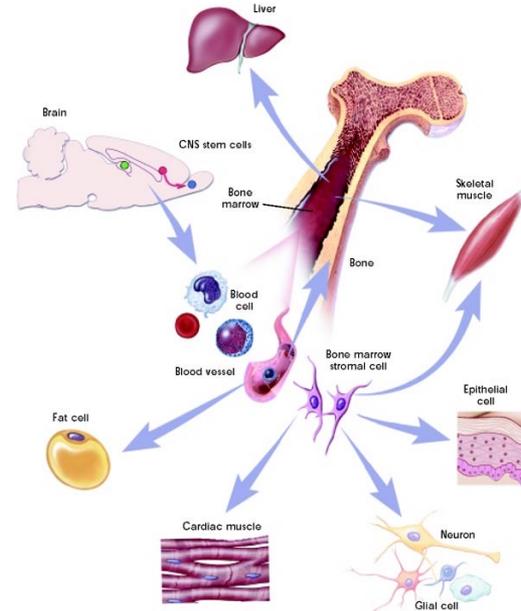
Pluripotent



Adult Stem Cells

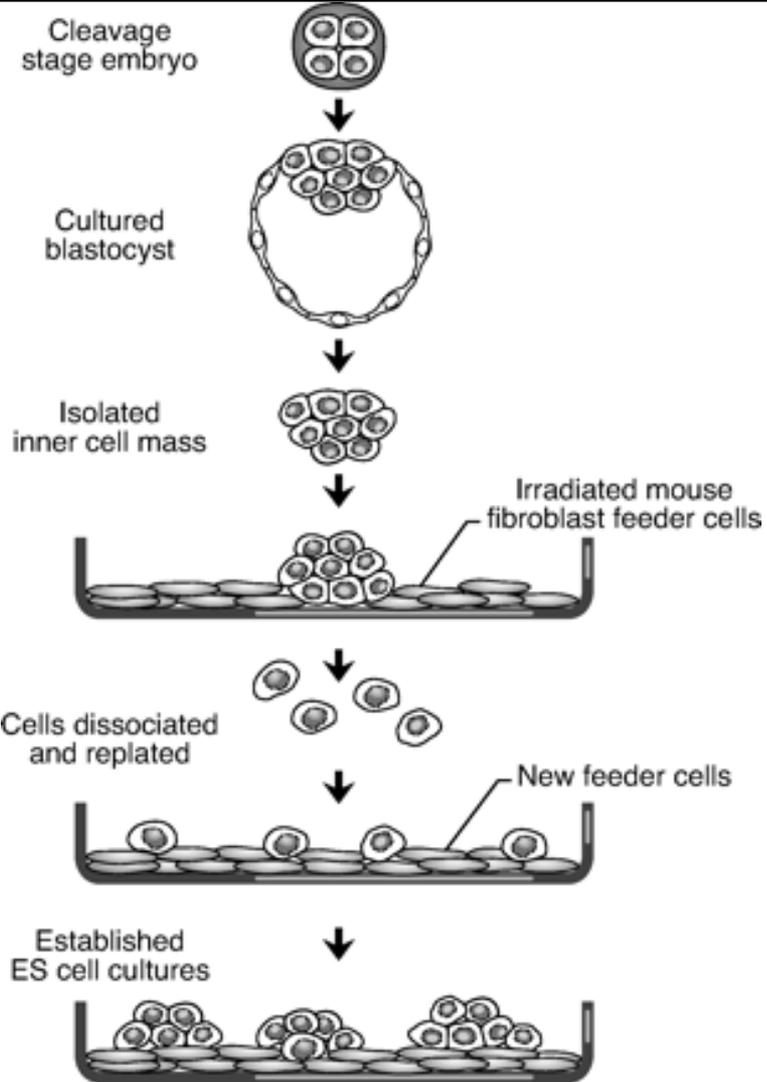
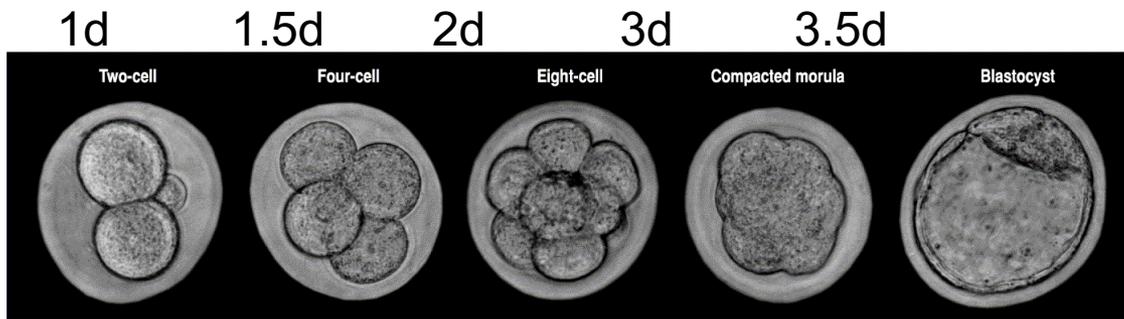
Residue within adult tissues

Multipotent

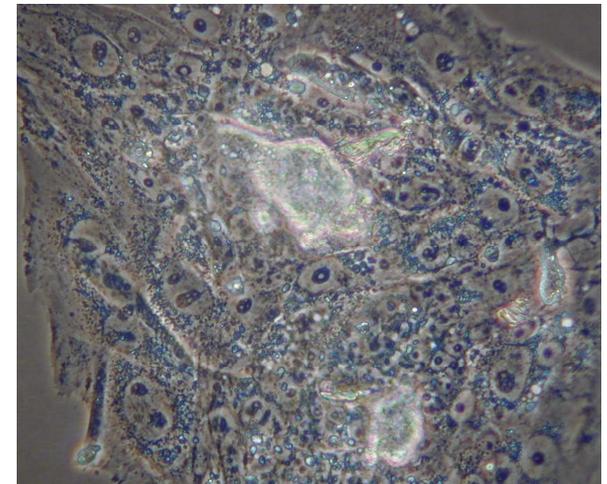


Cellule embrionali staminali, ES cells, da dove vengono e come si possono isolare.

- Le ES derivano dalla massa cellulare interna (inner cell mass, ICM) della blastociste, e hanno la potenzialità di sviluppare tutti i tessuti embrionali, e contribuire ad un nuovo organismo (anche alle cellule germinali) se trapiantate in una blastocisti.
- Se trapiandate in altra sede danno luogo a tumori: teratocarcinomi (tumori in cui ci sono diversi tipi cellulari).
- Non contribuiscono agli annessi embrionali
- Per creare ES per la ricerca bisogna sviluppare linee cellulari ES dalla ICM dell'embrione (3.5 dpc, nel topo).
- Una linea di ES comprende cellule identiche con le stesse capacità proliferative e differenziative.
- Se coltivate con cura posso crescere immutate per una trentina di passaggi.



Derivazione di ES murine



Coltura di ES

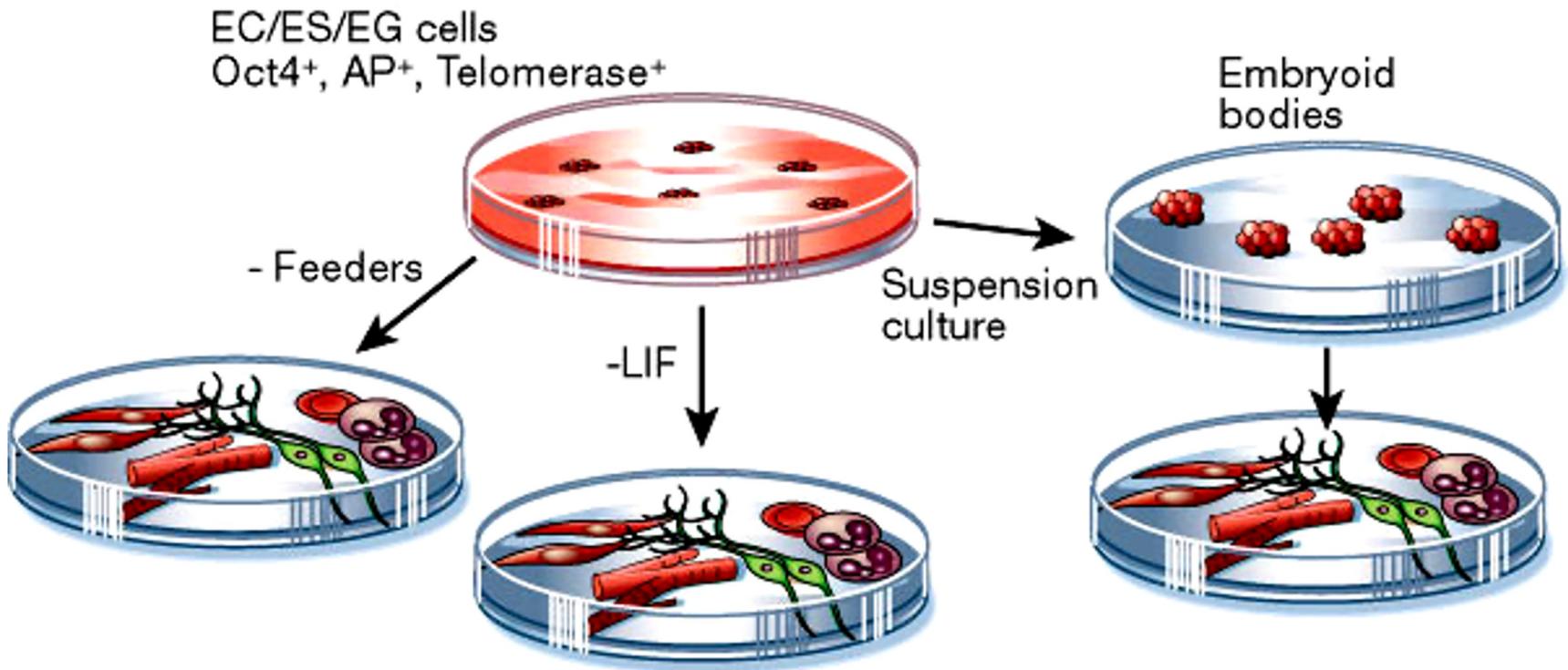
Properties:

- in vitro culture for very long time periods
- unlimited amount of cells
- no signs of aging or senescence

LIF (leukaemia inhibitory factor)

Mantiene le ES in uno stato indifferenziato

Le ES differenziano spontaneamente se si lasciano aggregare in corpi embrionali in assenza di LIF



Intrinsically expressed transcription factors and extrinsically supplied cytokines are required to maintain ES cell pluripotency

ES cells express characteristic transcription factors:

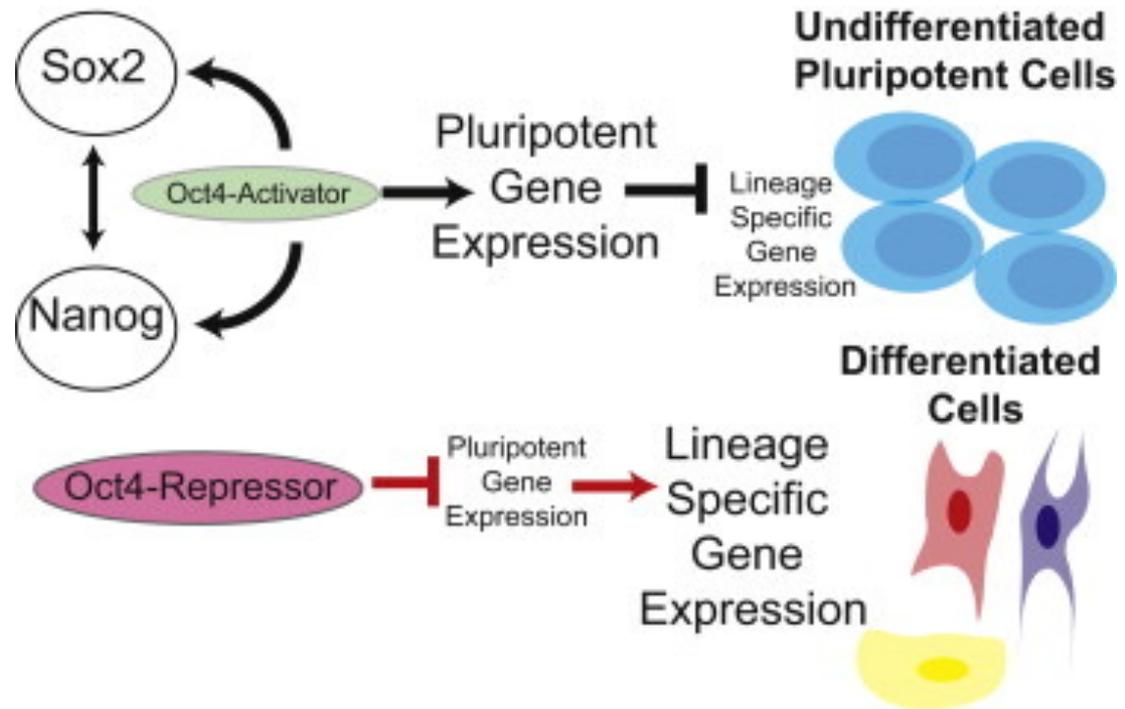
- **Oct-4**, encoded by *POU5f1*, a class V POU (Pit-Oct-Unc) domain protein
- **Nanog**, a novel homeodomain protein
- **Sox2**, an SRY-related HMG box protein
- Cell-surface markers are also expressed:
 - mES cells express SSEA-1 (stage specific embryonic antigen)
 - hES cells express SSEA-3 and SSEA-4
 - mES and hES cells express TRA1-60, TRA-81 and alkaline phosphatase

Mouse ES cells must also receive the cytokine LIF

Human ES cells are LIF-independent (Wnt signalling is the basis of pluripotency in human ES cells)

Fattori Trascrizionali responsabili della pluripotenza

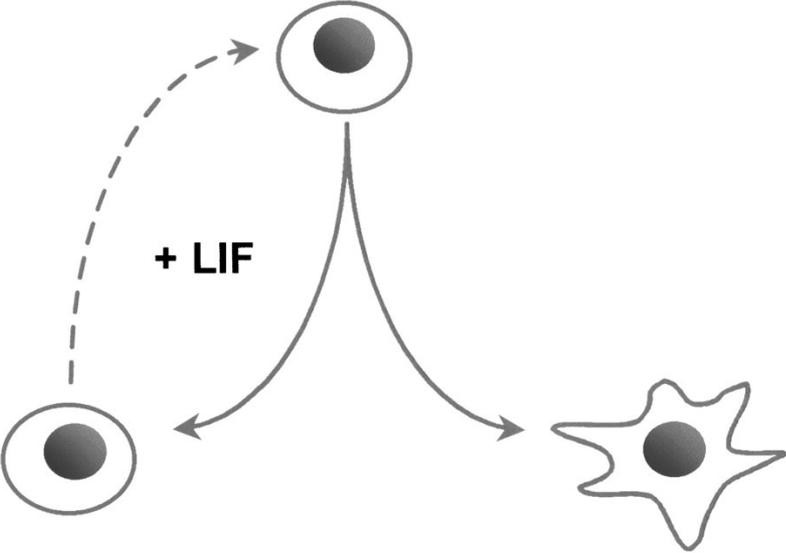
- Oct-4
- Sox2
- Nanog



Differenziamento spontaneo in assenza di

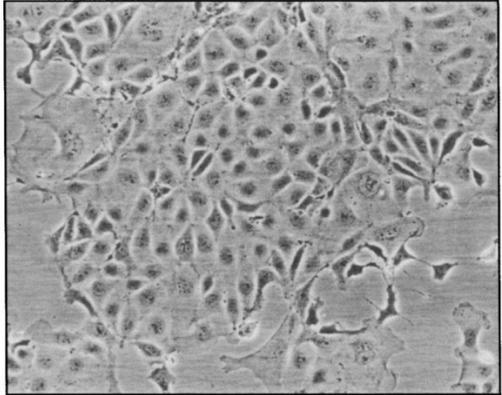
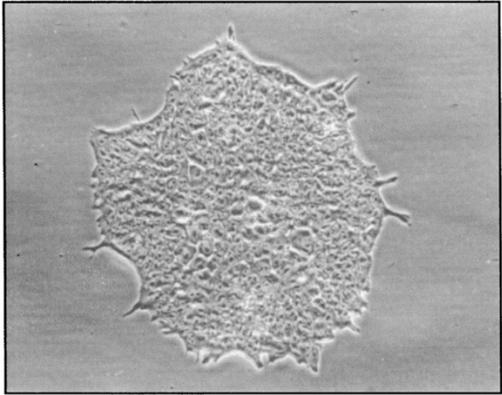
LIF

ES Cell



SELF-RENEWAL

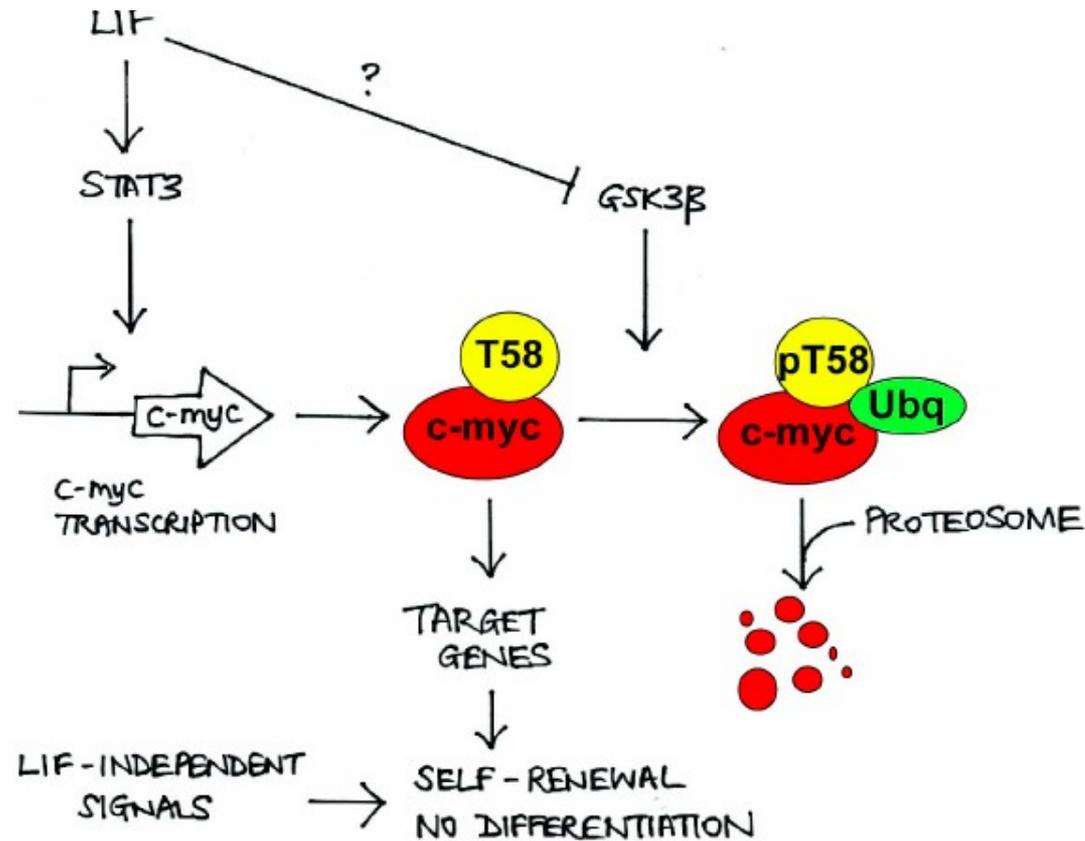
DIFFERENTIATION



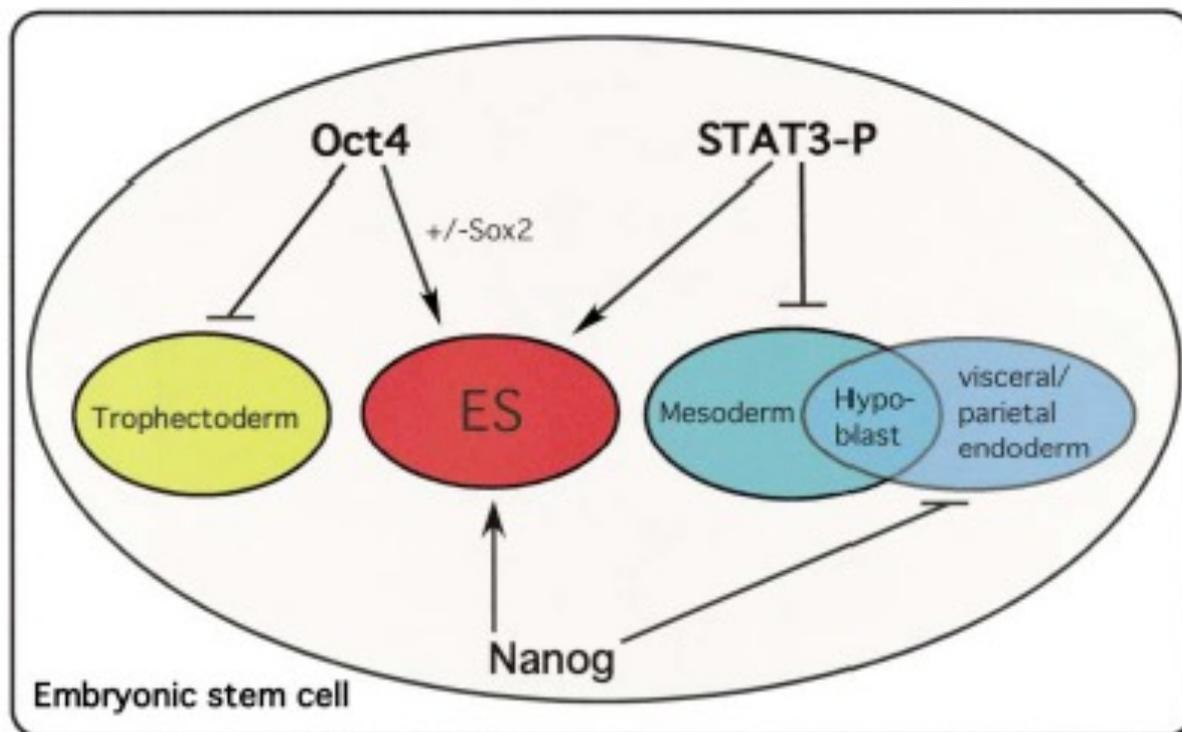
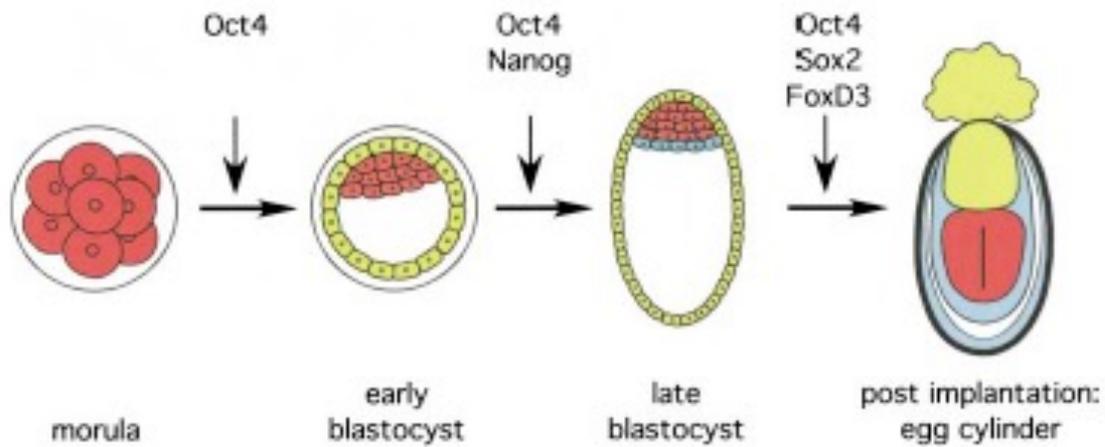
Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) promuove la pluripotenza e l' autorinnovamento attivando il pathway di STAT3

- LIF è un membro della famiglia di citochine IL6
- In assenza di un feeder layer di fibroblasti inattivati è in grado di mantenere la pluripotenza delle ES.
- Se e' non viene aggiunto, le ES differenziano e possono formare corpi embrioidi da cui derivano tipi cellulari diversi
- La segnalazione avviene mediante legame di LIF al suo recettore LIF-R che dimerizza con gp130
- La dimerizzazione attiva JAK che e' una tirosina kinasi
- JAK fosforila tirosine su LIF-R e gp130
- STAT3 viene reclutato alle Tyr fosforilate dove e' esso stesso fosforilato
- STAT3 fosforilato dimerizza trasloca al nucleo e attiva l' espressione di geni target

- Uno dei target di STAT3 è Myc che a sua volta attiva la trascrizione di altri geni: uno di questi è TERT, una subunità regolatoria della telomerasi
- Quando non c'è LIF il turnover di myc si sposta verso la degradazione

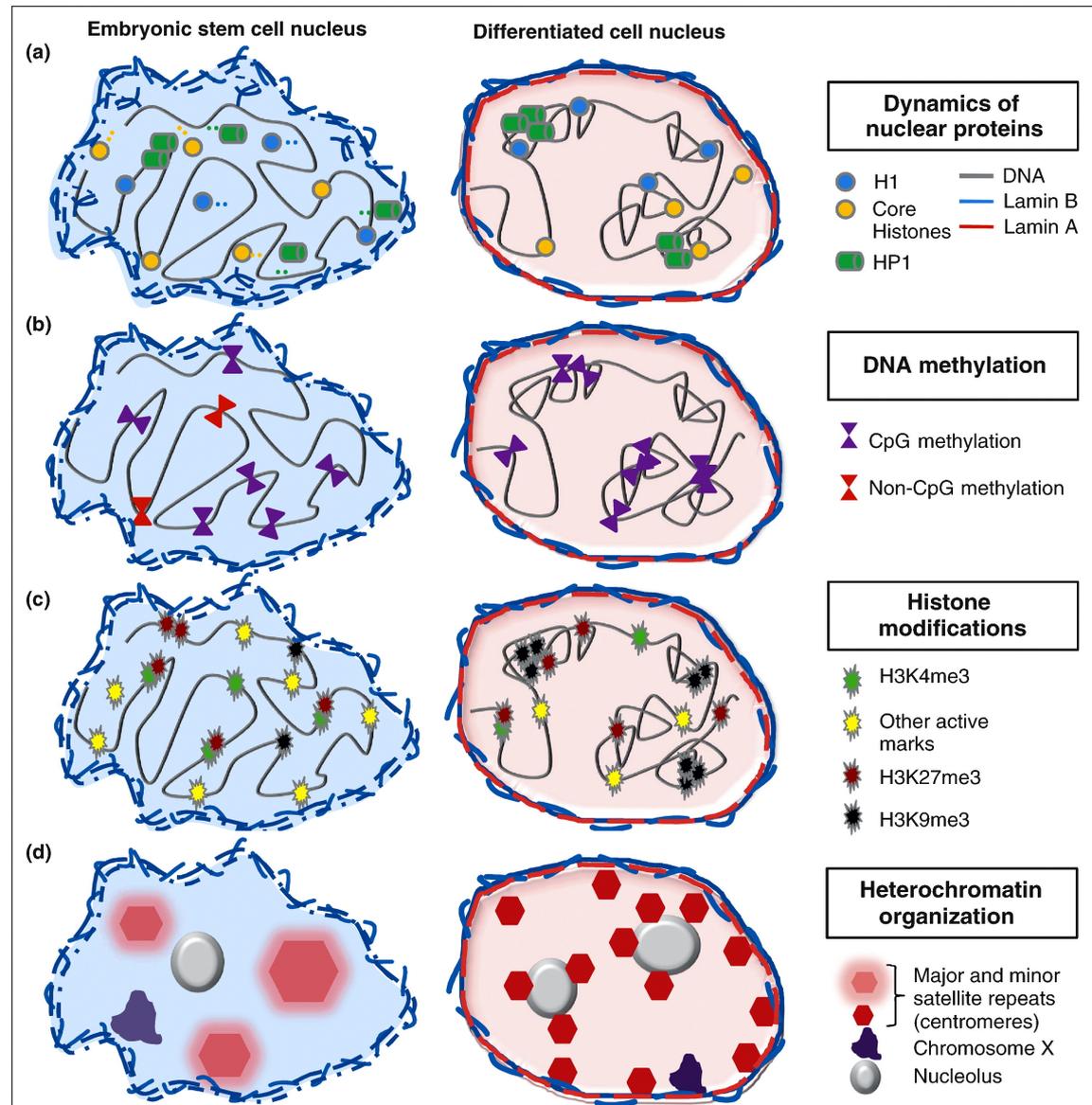


Based on
Cartwright et al.
(2004) Fig. 7

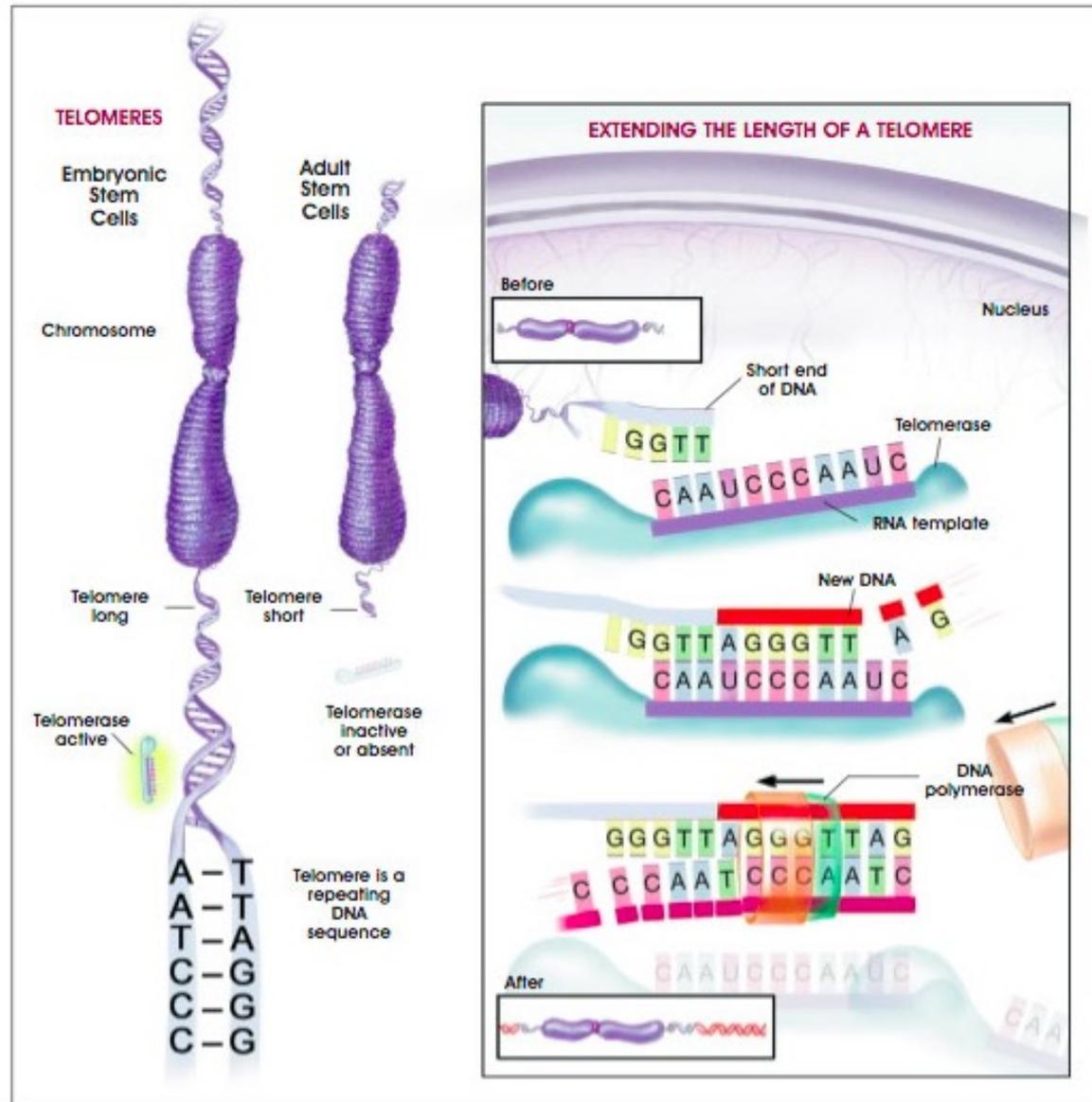


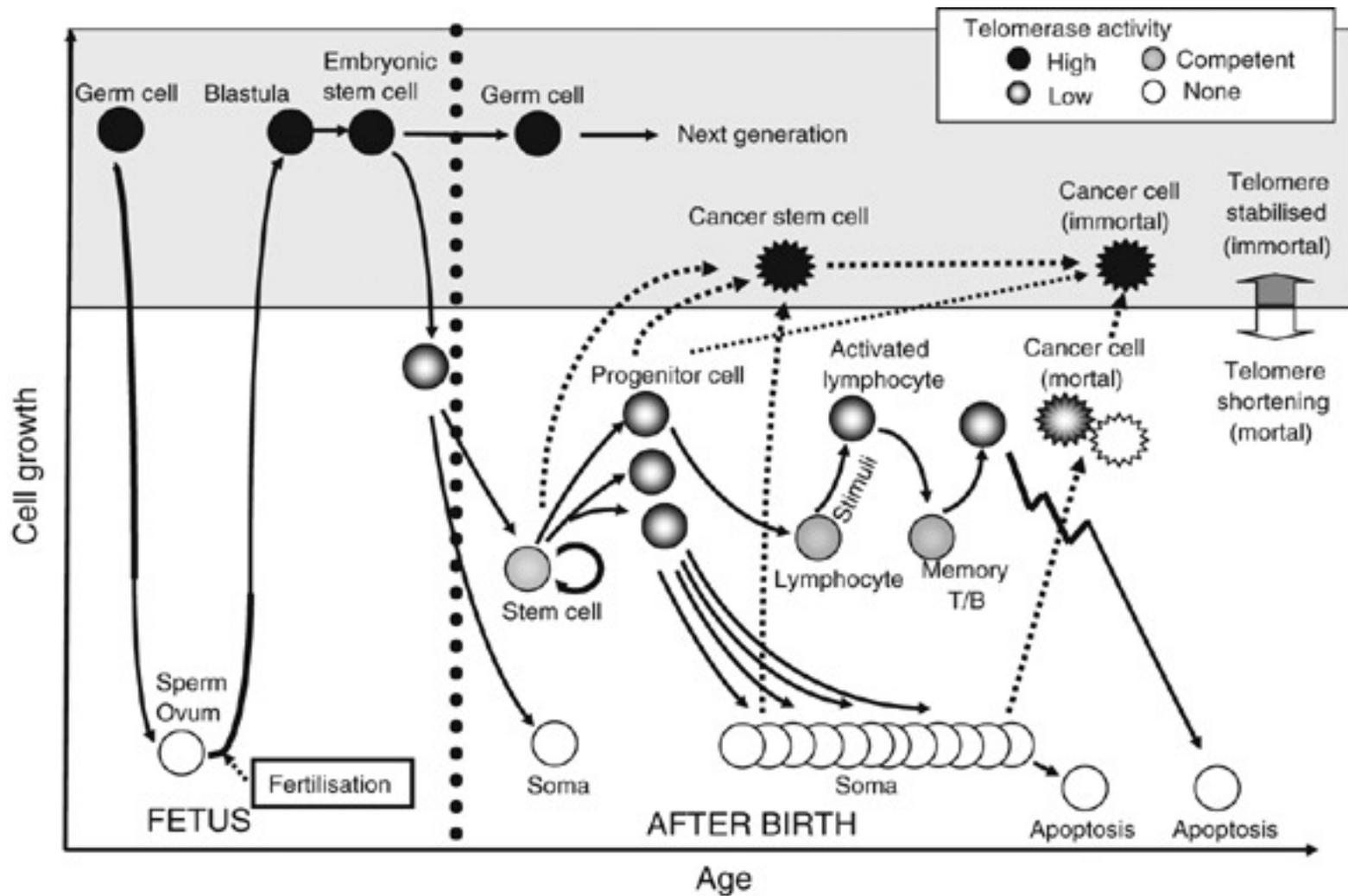
Il ruolo della cromatina nelle cellule ES

- Le ES hanno un potente sistema di rimodellamento della cromatina

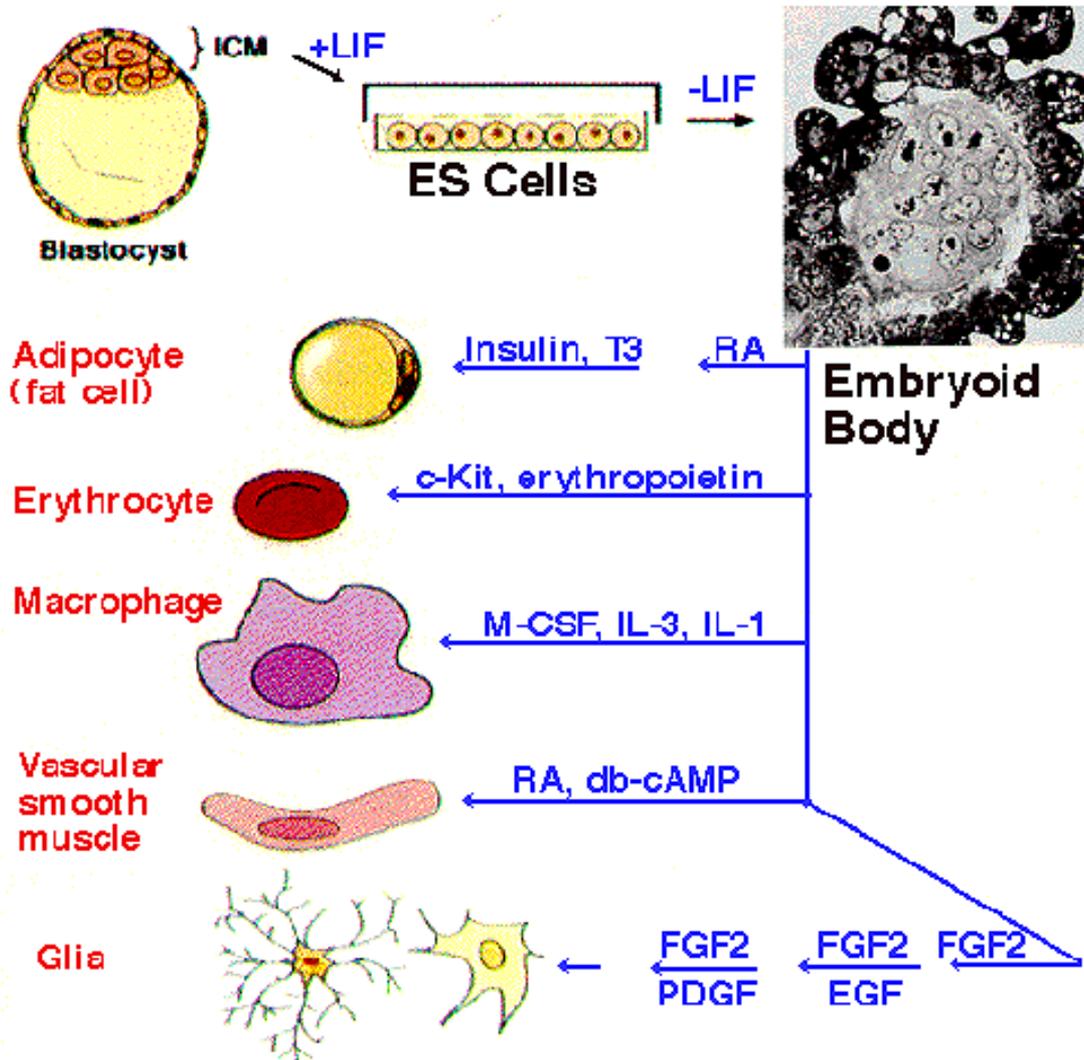


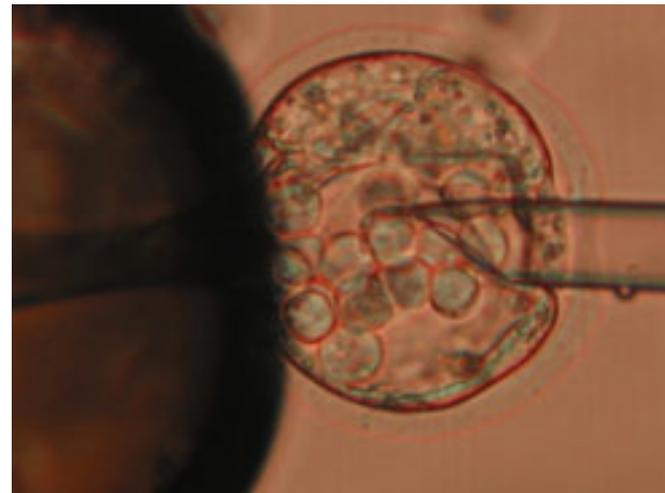
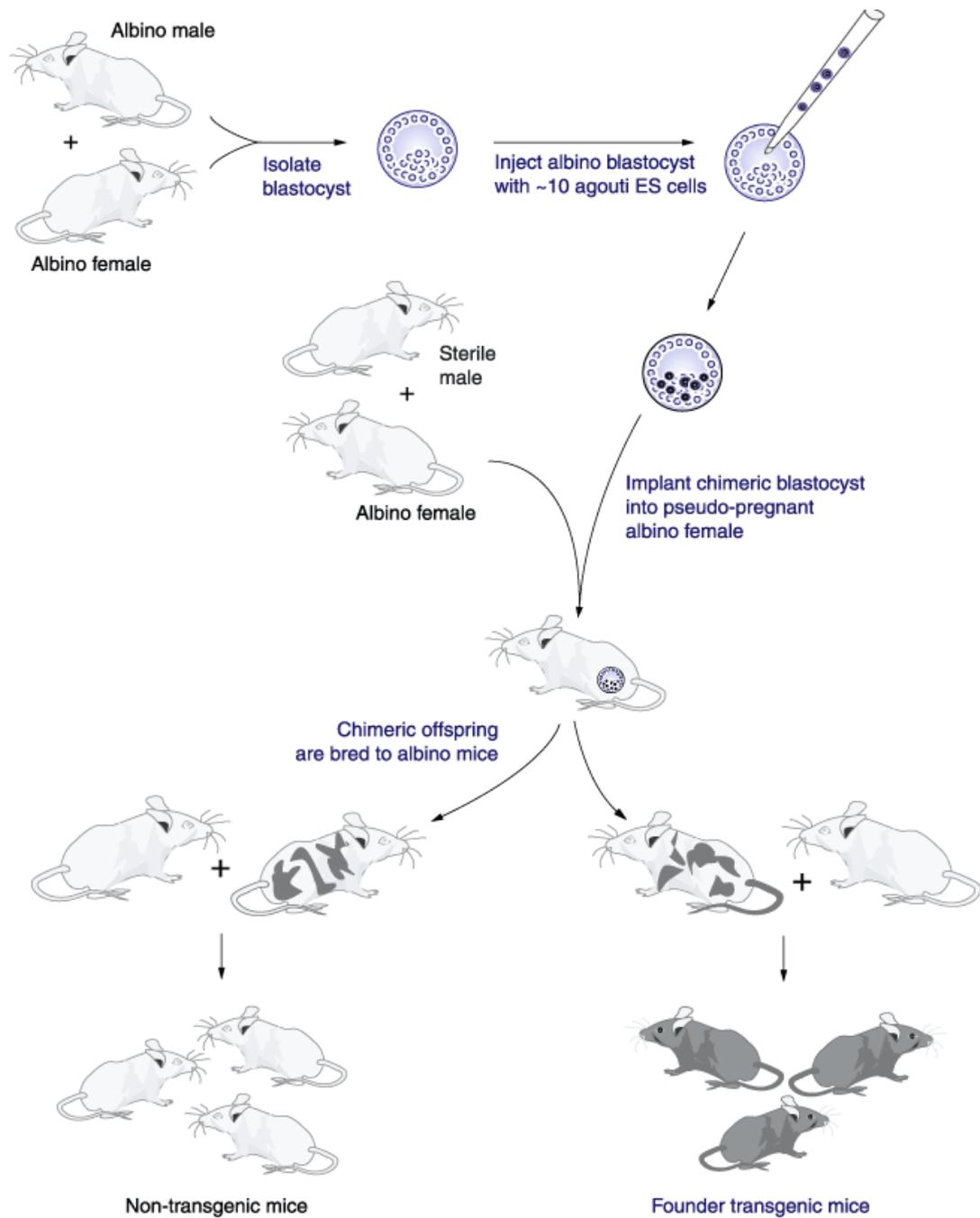
L' integrità dei telomeri e' regolata dalle telomerasi: la senescenza è ritardata



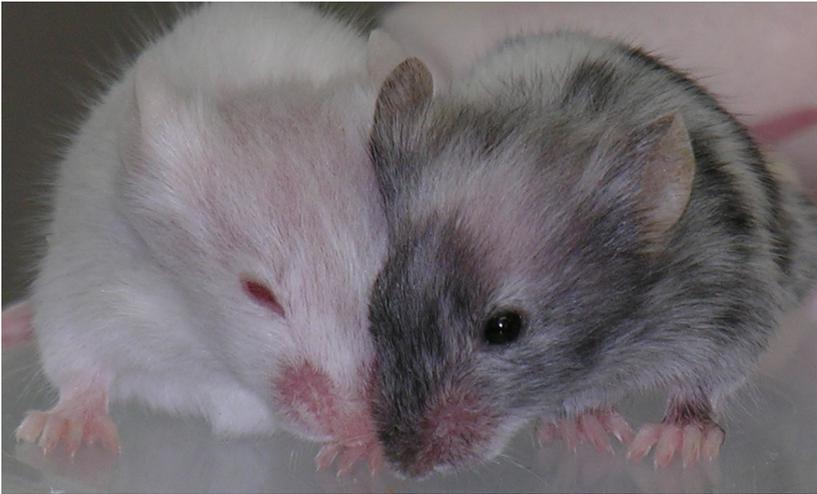


Come differenziare le ES: pathway noti





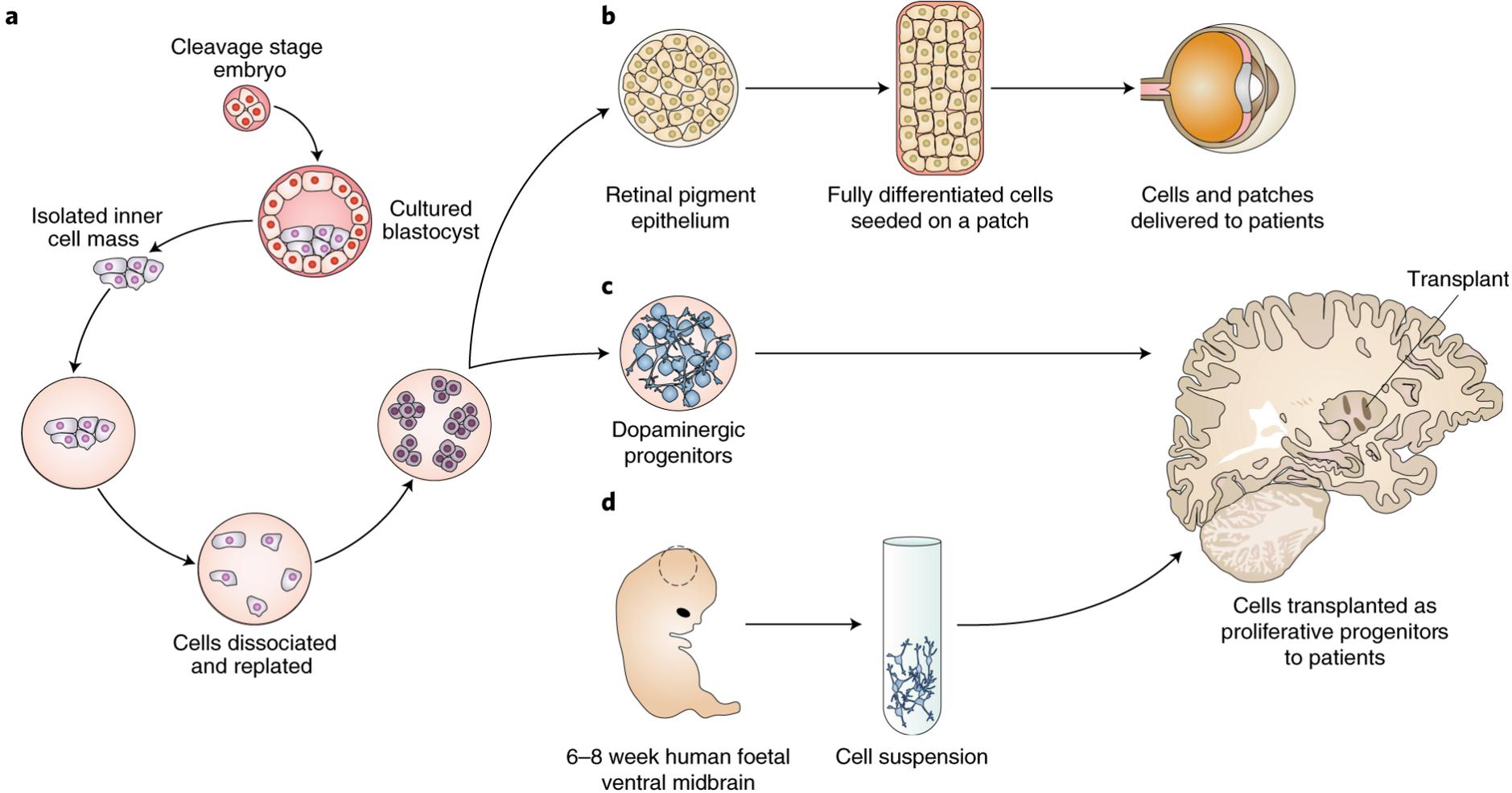
Chimere



C57BL6 ES cells (black) injected
in albino FVB blastocyst



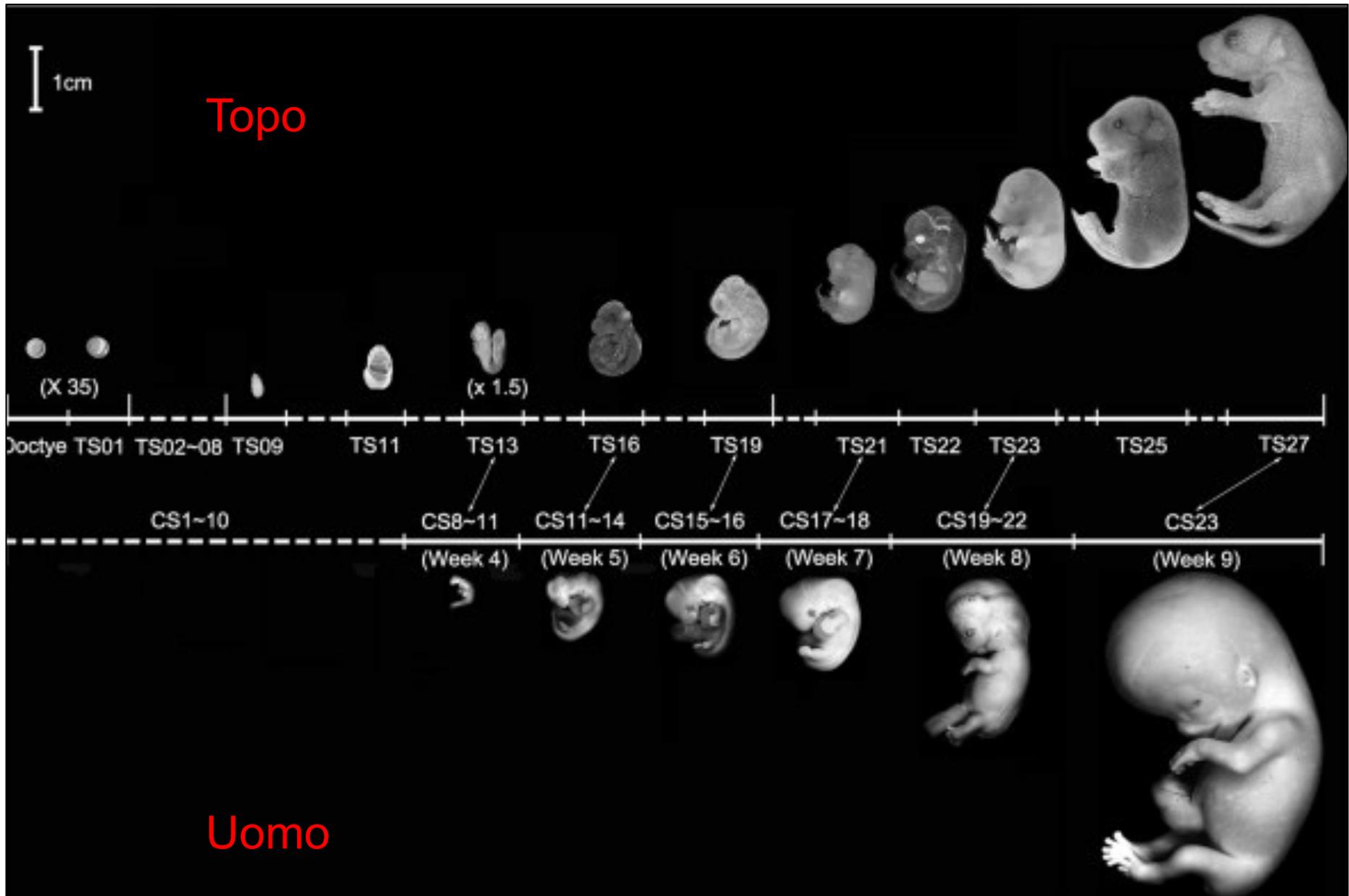
R1 ES (agouti) cells injected in
CBA (brown) blastocyst



a, Human embryonic stem cells (hESCs) are derived from supernumerary pre-implantation embryos and can be grown in culture indefinitely. These cells are pluripotent and can give rise to any cell type in the body. b, Fully mature retinal pigment epithelium (RPE) cells derived from hESCs and seeded on a patch have been transplanted into eyes of patients with age-related macular degeneration (AMD). c, For cell-based therapy in Parkinson's Disease, ESC-derived neural progenitors with the capacity to give rise to fully mature and functional neurons are transplanted into the brain. d, Proof of concept that transplantation of dopaminergic progenitors can work comes from clinical trials in which these cells have been harvested from human foetal brain and transplanted into the putamen of patients with Parkinson's Disease

Adult stem cells: definizioni

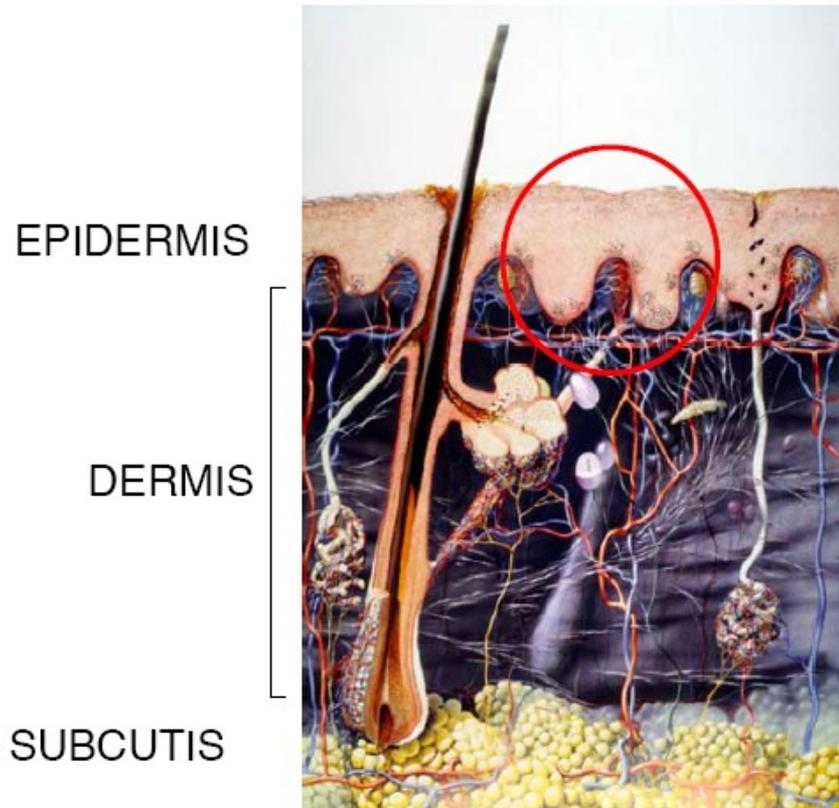
- Una cellula staminale adulta, o cellula staminale somatica, è una cellula staminale che si può trovare tra le cellule differenziate in un tessuto o organo.
- La cellula è in grado di dividersi (self renewal) e differenziare per dare origine a cellule specializzate all'interno di quel tessuto o organo.
- Il loro ruolo principale è quello di mantenere e riparare il tessuto in cui risiedono.
- Molte risiedono in specifiche nicchie, dove rimangono quiescenti finchè non vengono attivate in seguito a danno tissutale o malattia.
- Le cellule staminali adulte più studiate sono le cellule ematopoietiche.



Adult vs. Embryonic Stem Cells

- Cellula indifferenziata che si può trovare in tessuti differenziati adulti
- Capace di “self renewal”
- Si può dividere e generare una cellula differenziata e una cellula staminale (multipotente, unipotent)
- Derivazioni principale : midollo osseo, sangue, occhio, cervello, fegato, pelle, rivestimento dell'intestino, muscolo?
- Deriva da tessuti embrionali
- Capace di “self renewal”
- Potenzialità a differenziarsi in tutti o quasi tutti i tessuti del corpo (totipotente o pluripotente)
- Derivazione principale: ICM della blastociste

STRUCTURE OF HUMAN SKIN



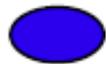
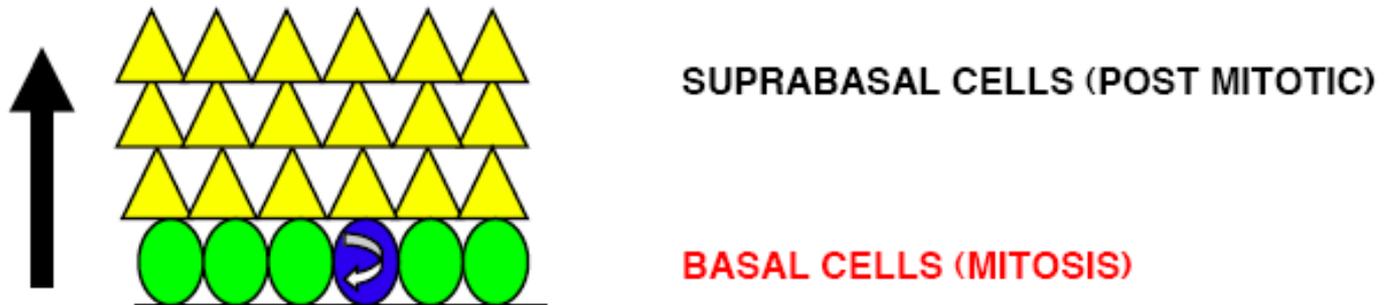
EPITHELIAL STEM CELLS IN
EPIDERMIS, HAIR FOLLICLES
AND SWEAT GLANDS

MESENCHYMAL STEM CELLS IN
DERMIS AND HAIR FOLLICLES

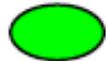
MELANOCYTE STEM CELLS

THE RENEWAL OF EPIDERMIS

Epidermal stem cells: Unipotent

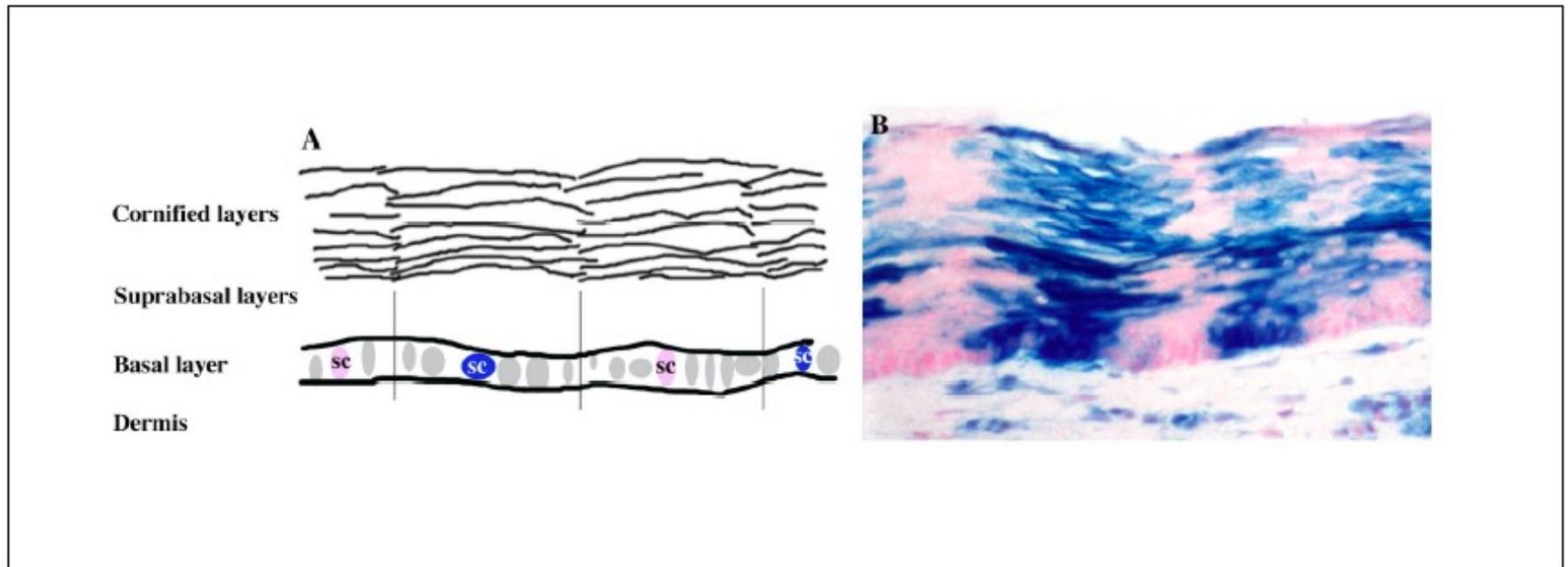


STEM CELL



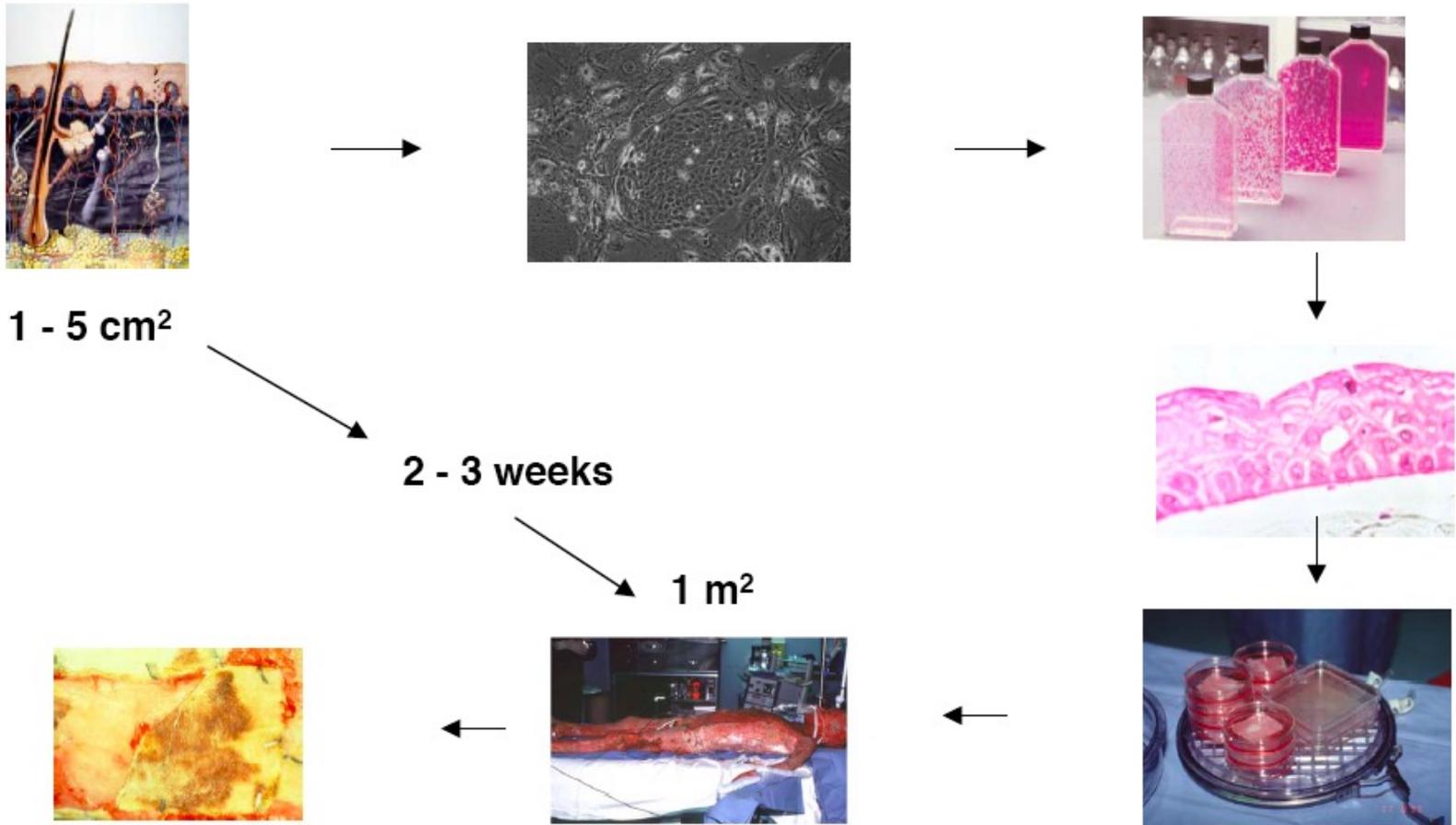
TRANSIT AMPLIFYING CELL (4 DIVISIONS MAXIMUM)

COLUMNAR ORGANIZATION OF THE EPIDERMIS (MOUSE)



FROM GAMBARELLA AND BARRANDON CURR OPIN CELL BIOL 2003

EX VIVO EXPANSION OF ADULT AUTOLOGOUS EPIDERMAL STEM CELLS



FROM HOWARD GREEN AND COLLEAGUES

(Rheinwald and Green, 1975, Gallico et al., N. Engl. J. Med. 1984)

9 YEAR OLD
95% BODY AREA
THIRD DEGREE BURNS
EXCISED TO FASCIA

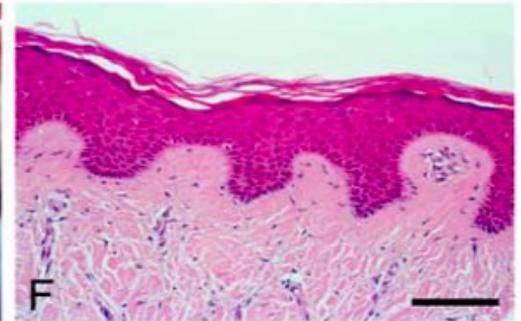
NO SPONTANEOUS HEALING



AUTOLOGOUS SKIN TRANSPLANTATION



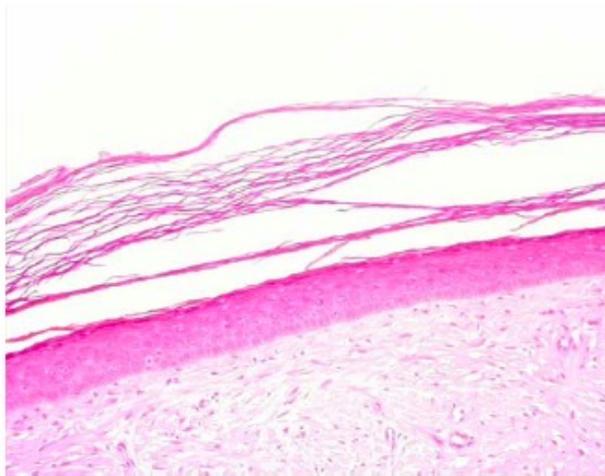
SPLIT THICKNESS GRAFTS
and
CULTURED EPITHELIUM GRAFTS



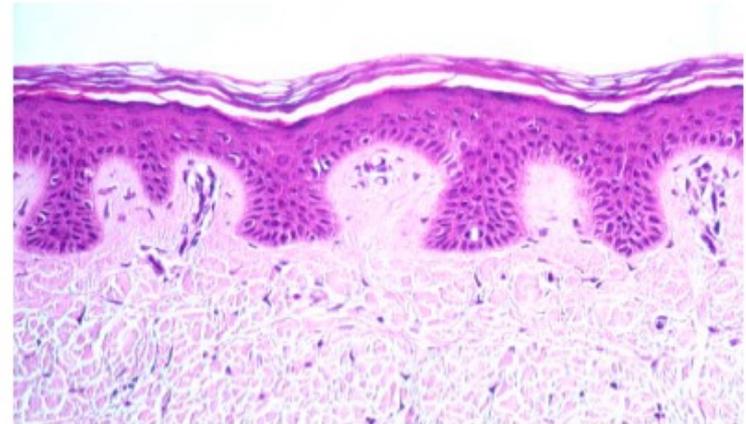
REGENERATION OF EPIDERMIS



NORMAL SKIN



SPONTANEOUS HEALING



**EPIDERMIS GENERATED FROM TRANSPLANTED
STEM CELLS**

(3.5 years after transplantation)

Ronfard et al., TRANSPLANTATION 2000

AUTOLOGOUS CUTANEOUS CELL THERAPY

- **REGENERATION OF EPIDERMIS**

NORMAL STRATIFIED KERATINIZED EPITHELIUM
PRESENCE OF HOLOCLONES

- **REGENERATION OF SURPERFICIAL DERMIS**

ONDULATED DERMO-EPIDERMAL JUNCTION
PRESENCE OF SUBEPIDERMAL VASCULAR ARCADES
PRESENCE OF ELASTIC FIBERS

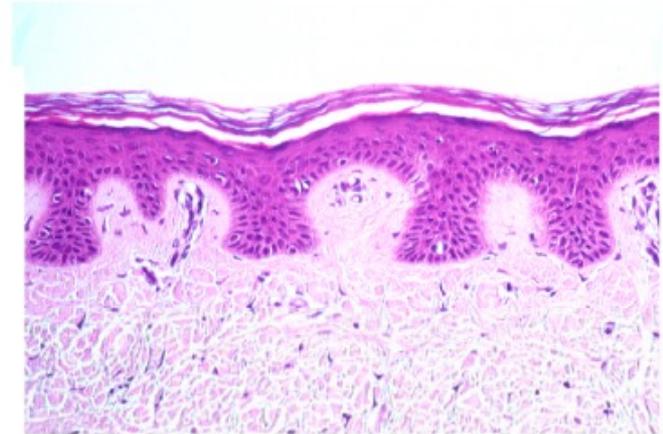
OBSERVED IN FETAL WOUND HEALING

NEVER OBSERVED IN NORMAL POST-NATAL WOUND HEALING

- **ABSENCE OF EPIDERMAL APPENDAGES**

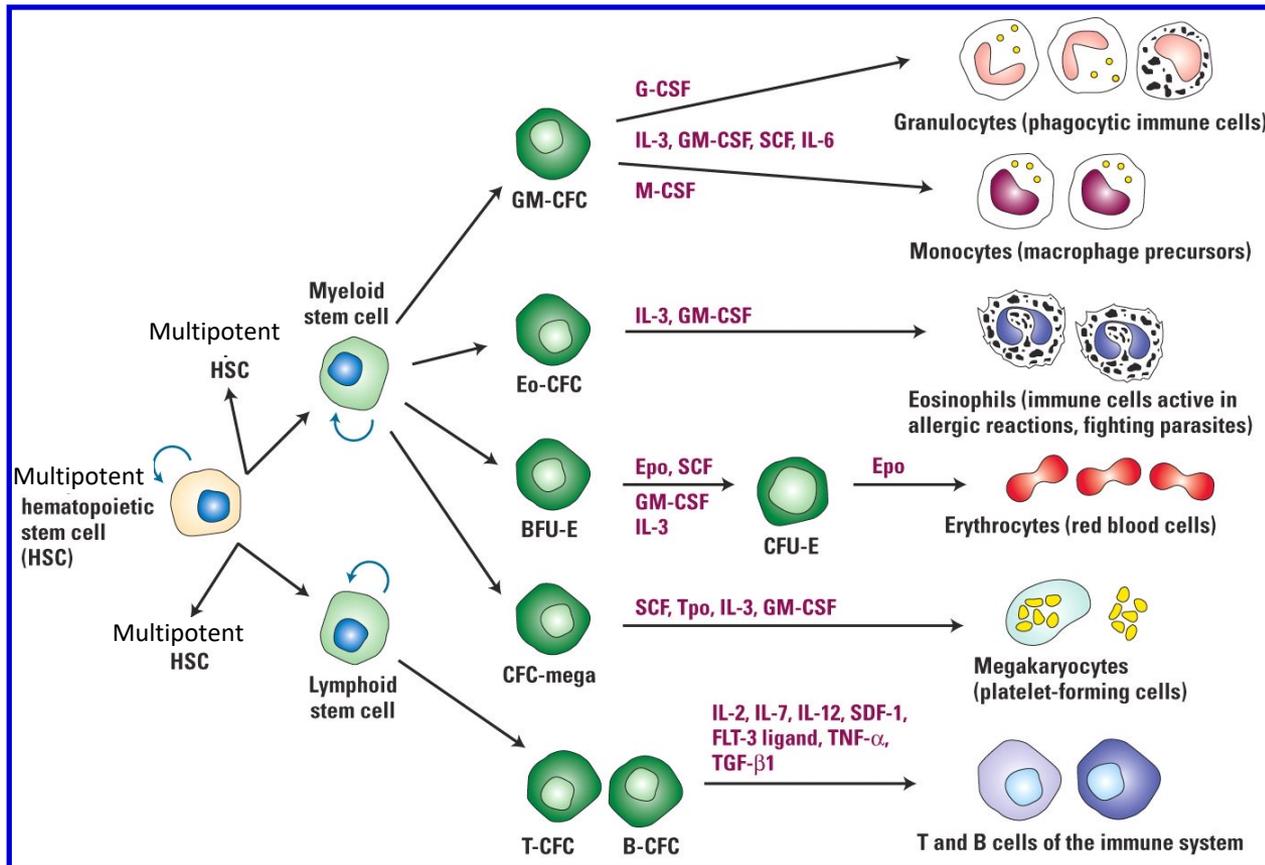
SWEAT GLANDS, SEBACEOUS GLANDS, HAIR FOLLICLES

BIOPSY 3 1/2 YEARS AFTER TRANSPLANTATION

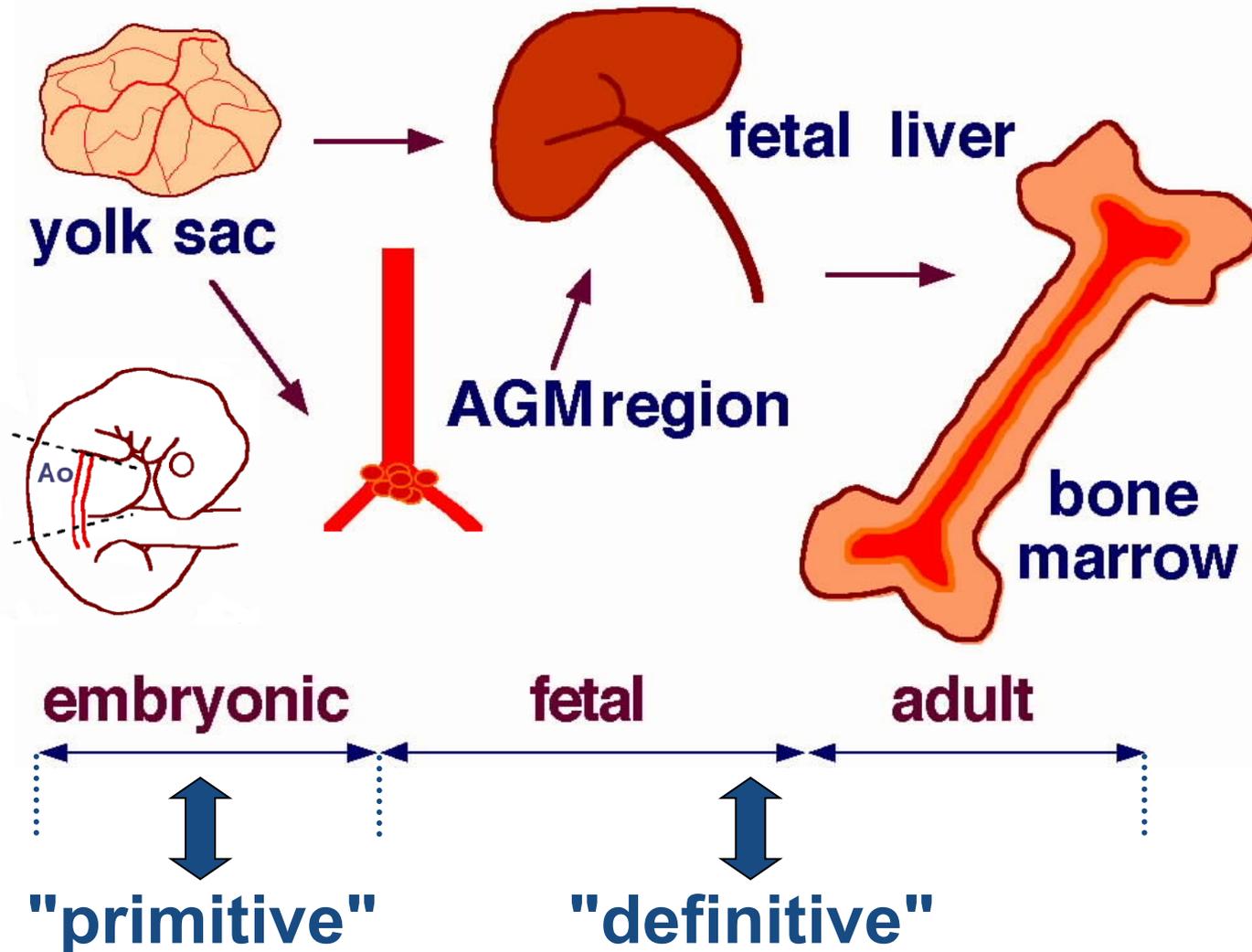


PRESENCE OF HOLOCLONES

Hematopoietic Stem Cells of the Bone Marrow: multipotent stem cells



Shifts in site of hematopoiesis during development



Primitive versus definitive hematopoiesis

Primitive

Definitive

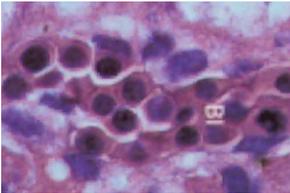
Site of production

Yolk sac

**Yolk sac
AGM
Fetal liver
Bone marrow**



Lineages



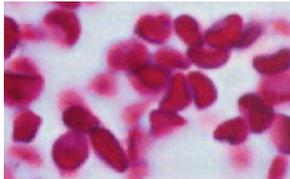
Embryonic globin genes

***** Primitive erythroblasts**

**Megakaryocytes
Macrophages**

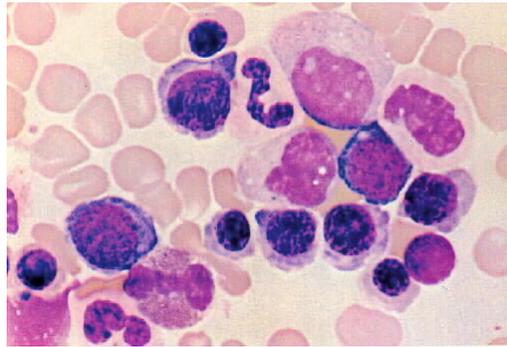
Definitive erythroid cells

All other hematopoietic lineages



Fetal and adult type globin genes

Adult hematopoietic system produces ~1 trillion blood cells each day

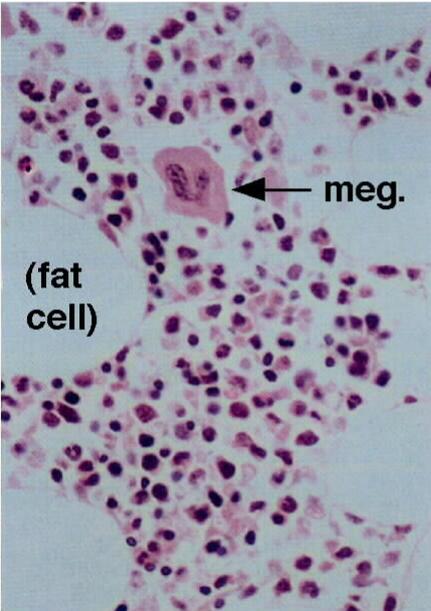


Continual process, involves sequential commitment of multipotent HSCs to gradually more restricted progenitor cells and finally to functionally distinct cells of mature blood (RBCs, platelets, neutrophils etc.)

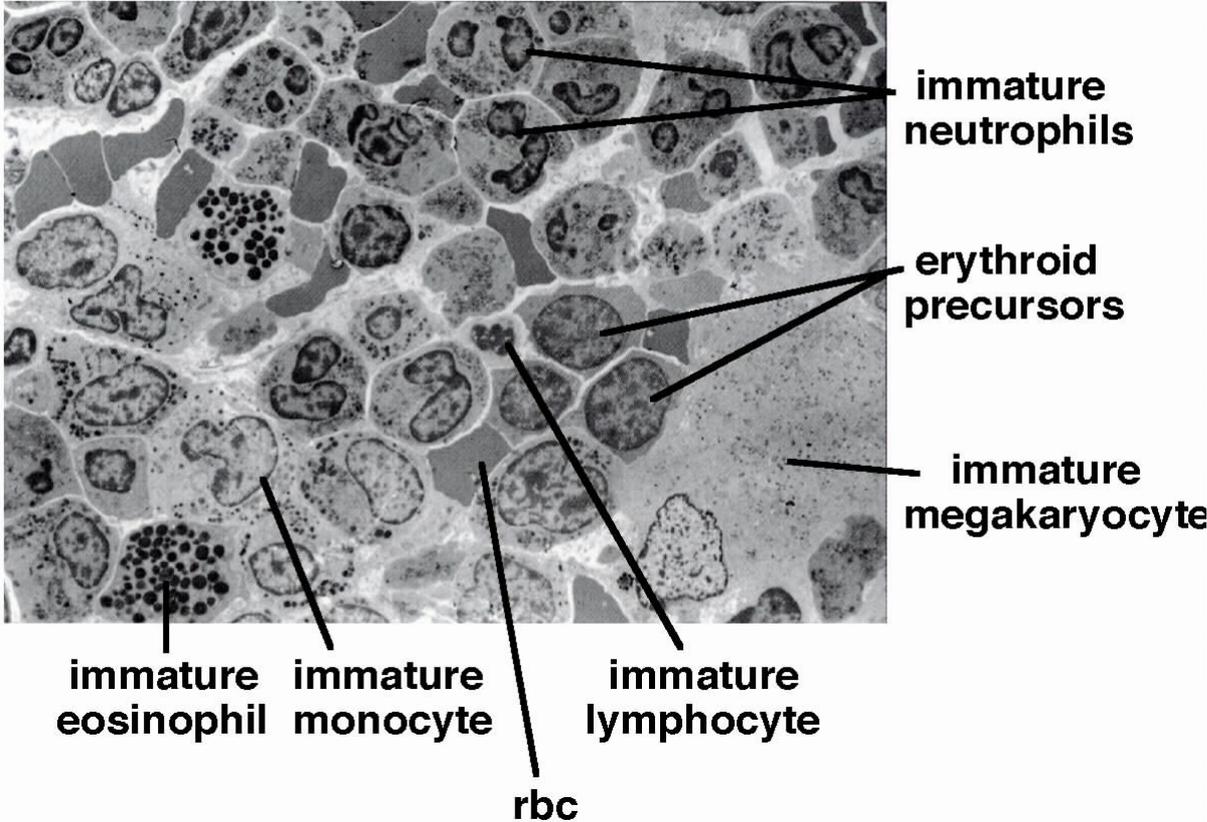
Understanding molecular mechanisms involved in determination of cell lineage is a central focus of the field of hematopoiesis.

Cellular composition of bone marrow

stained section



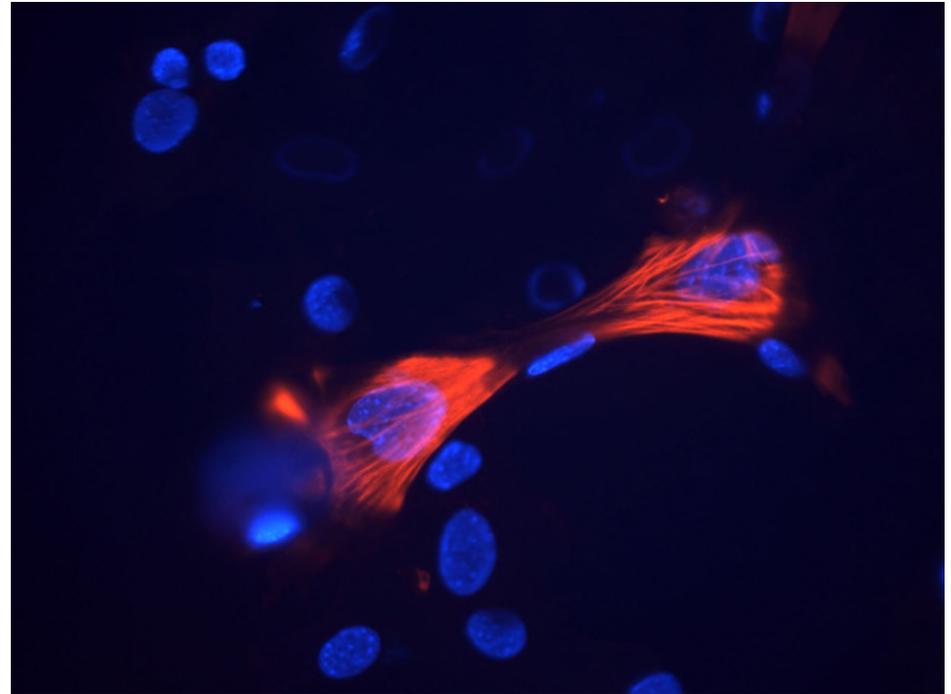
EM (low power)



Mesenchymal stem cells

multipotent stem cells

- These stem cells will differentiate into:
 - cartilage cells (chondrocytes)
 - muscle cells (myocytes)
 - fat cells (adipocytes)
 - tendons, ligaments, and connective tissue (epithelial cells including osteoblasts)
- These cells are located throughout the body
 - Bone marrow, fat, and cord blood are easiest to isolate



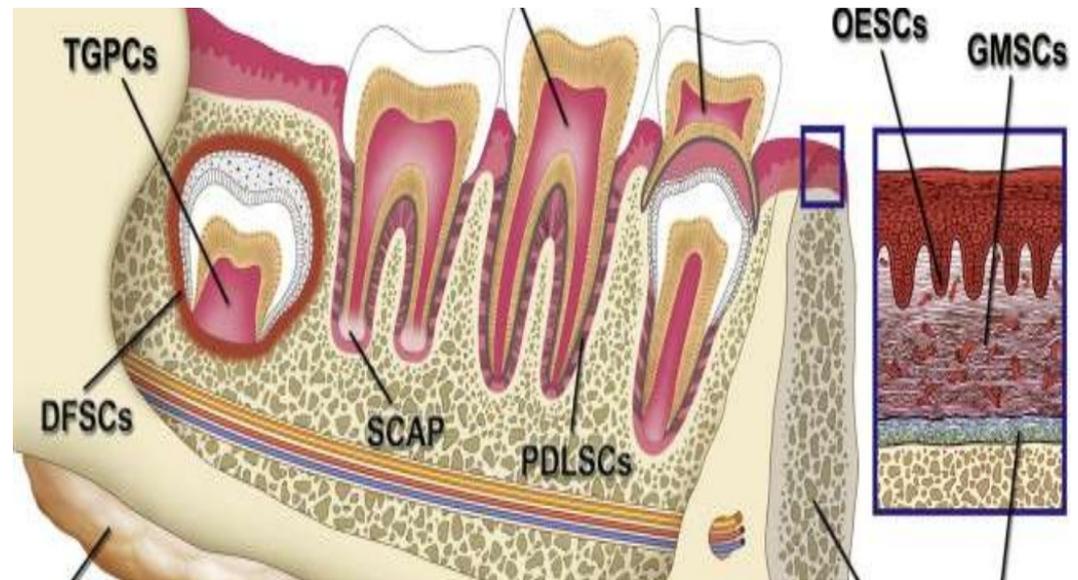
Smooth muscle cells (red)
© CIRM

Stem Cells Derived from Dental Tissues

- Mesenchymal Stem Cells (MSC's)
 - Sources:
 - Bone Marrow (Friedenstein et al, 1976; Caplan, 1991; Prockop, 1997; Pittenger et al, 1999; Gronthos et al, 2003)
 - Adipose Tissue/Umbilical Cord (Mareschi et al, 2001; Zuk et al, 2001)
 - Lineages:
 - Osteogenic
 - Chondrogenic
 - Adipogenic

Dental Tissue MSC's

- Human Pulp Tissue (DPSC's, post-natal dental pulp stem cells)
 - Gronthos et al, 2000
- Exfoliated Deciduous Teeth (SHED)
 - Miura et al, 2003
- Periodontal Ligament (PDLSC)
 - Seo et al, 2004
- Apical Papilla (SCAP)
 - Sonoyama et al, 2006, 2008
- Dental Follicle Precursors (DFPC)
 - Morsczeck et al, 2005



Dental Stem Cell Lineages

- Osteo/Odontogenic

- Adipogenic

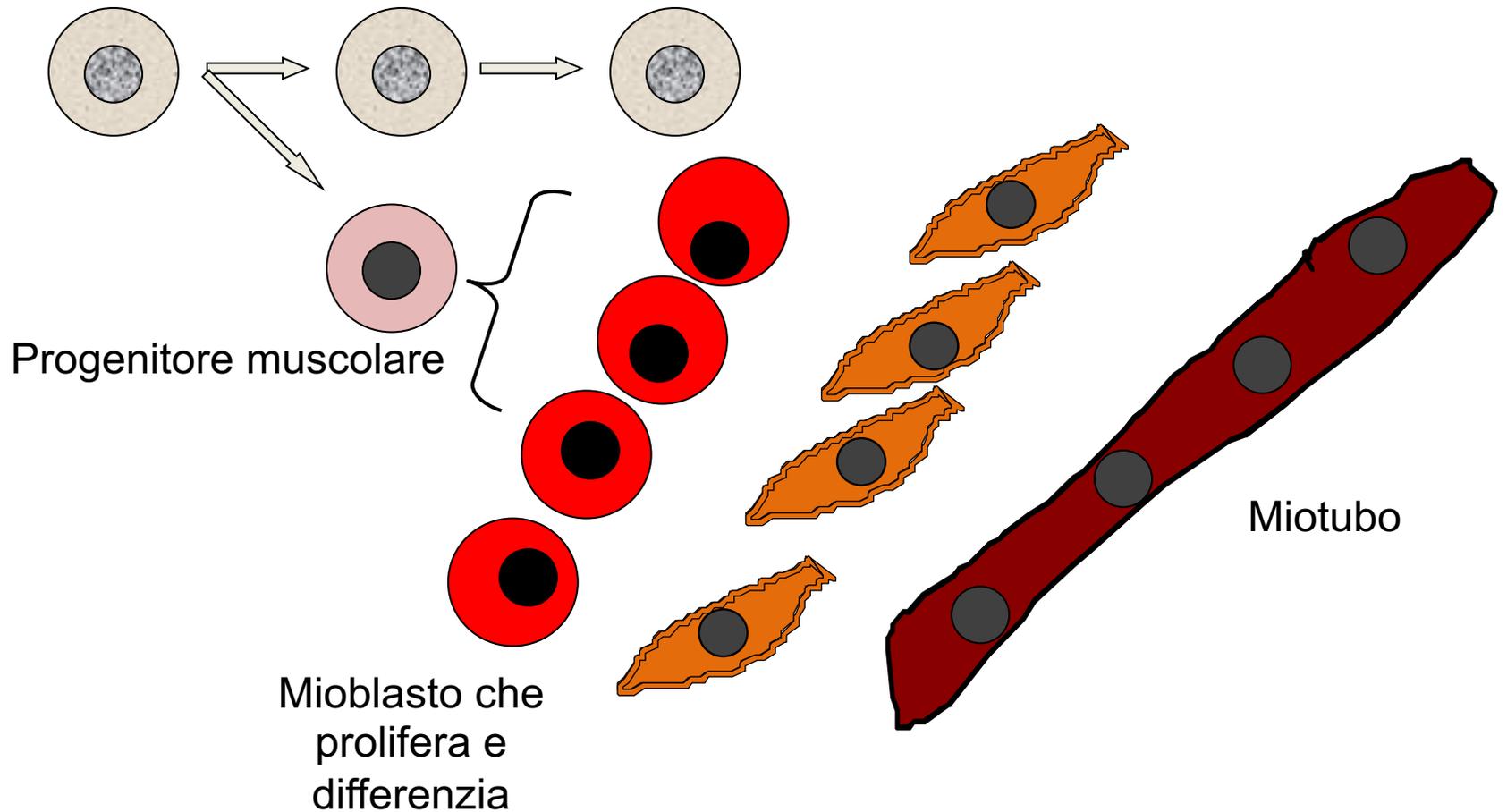
- Neurogenic

*Dental Stem cells appear to be more committed to odontogenic paths than BMMSC's

La potenzialità delle cellule staminali muscolari

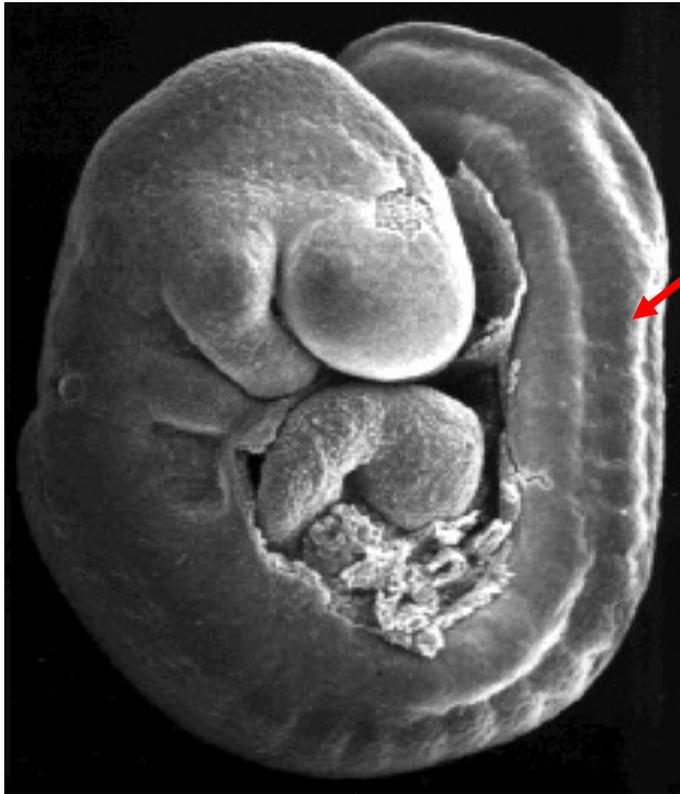
La cellula staminale muscolare è **unipotente**

Cellula staminale muscolare



Tutti i muscoli originano nell'embrione da strutture mesodermiche chiamate somiti

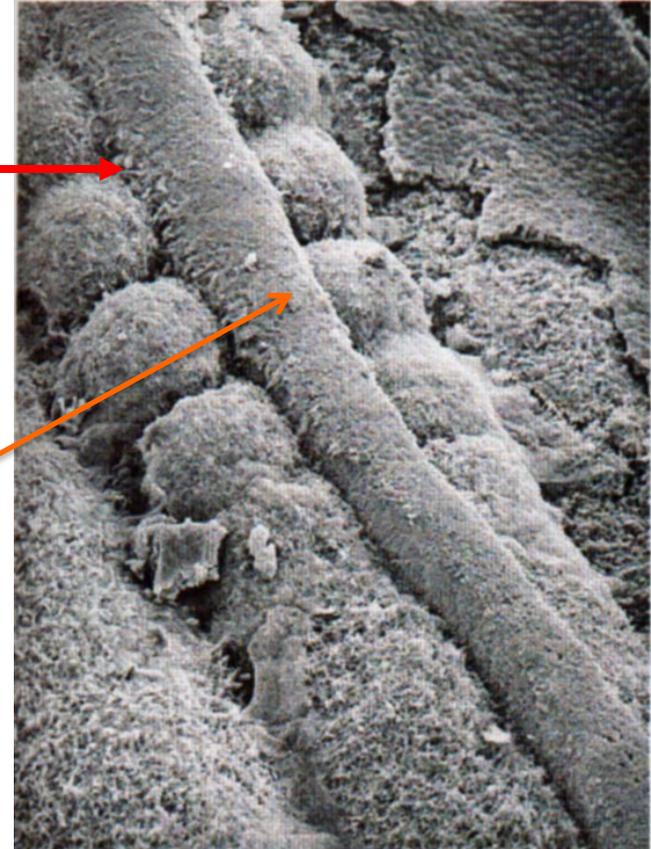
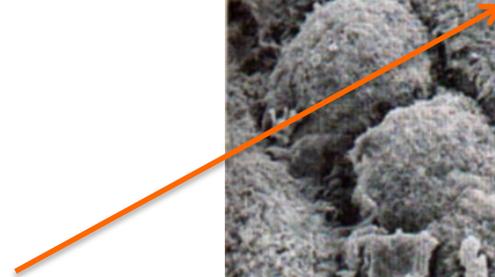
Embrione di topo 9.5 giorni dopo il concepimento



somite

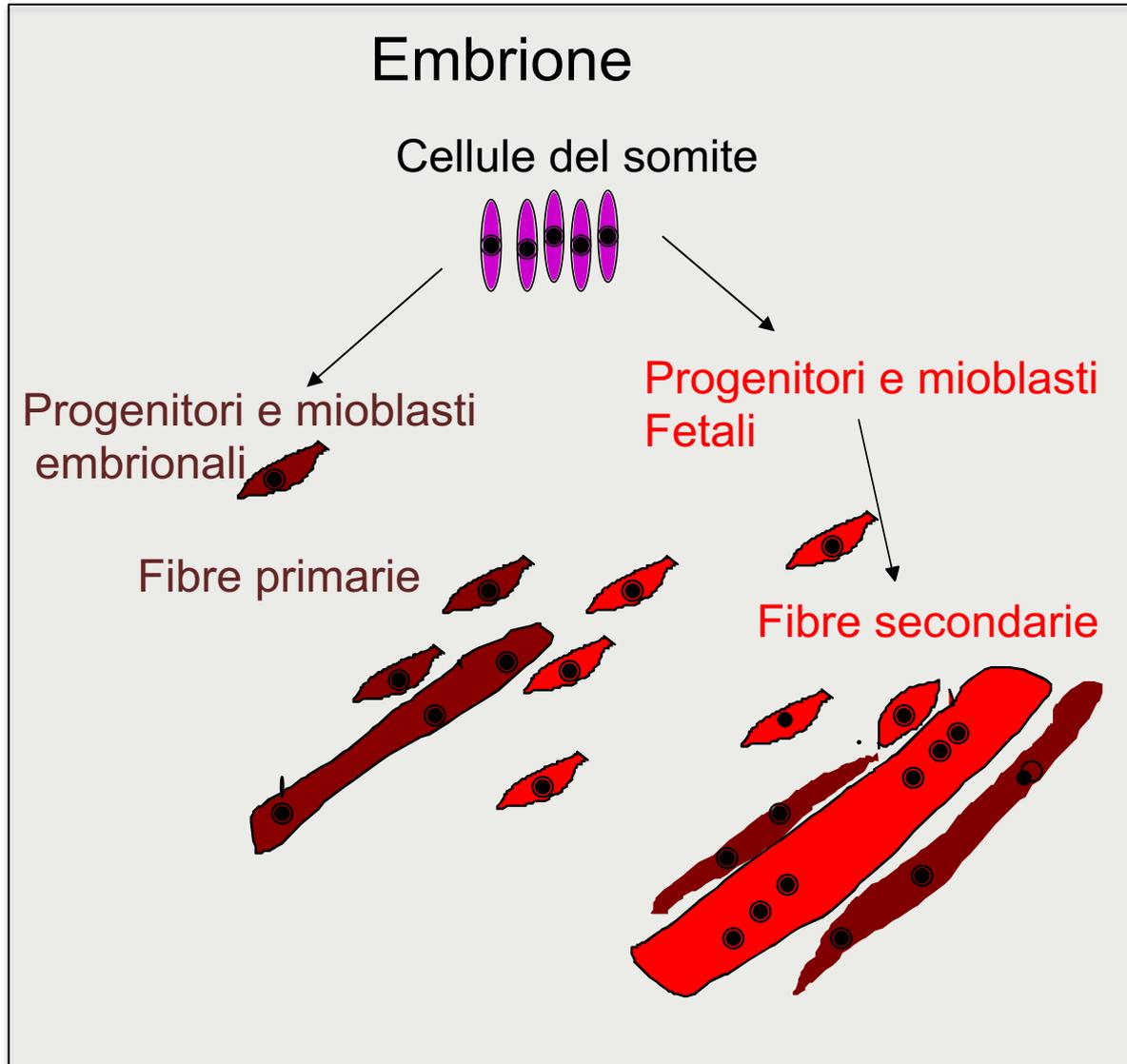


Tubo neurale

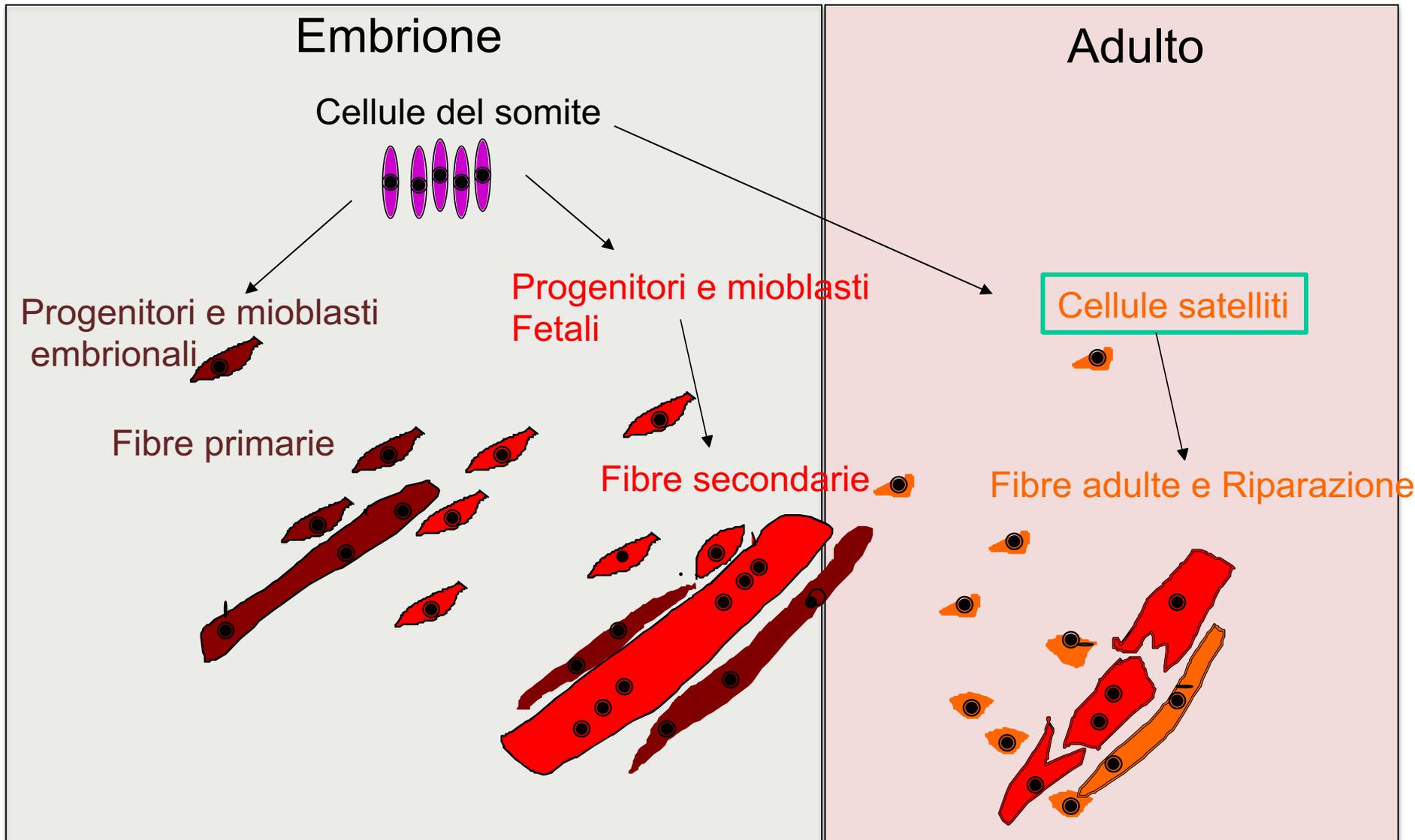


Bande compatte di cellule mesodermiche ai lati del tubo neurale
Mesoderma non segmentato
Si separa in blocchi di cellule (somiti)

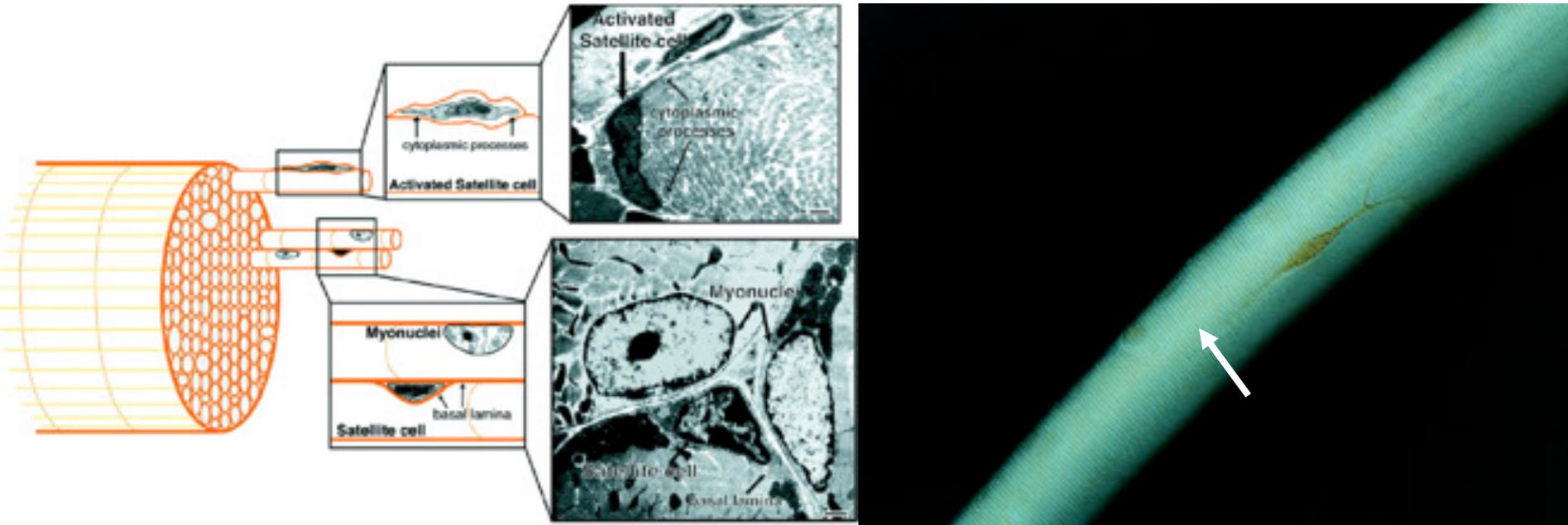
La miogenesi è un processo asincrono: a diversi stadi embrionali e nell'adulto fibre di tipo diverso sono formate da cellule progenitrici e staminali di tipo diverso.



La miogenesi, accrescimento e riparo nell'adulto sono a carico delle cellule satelliti.



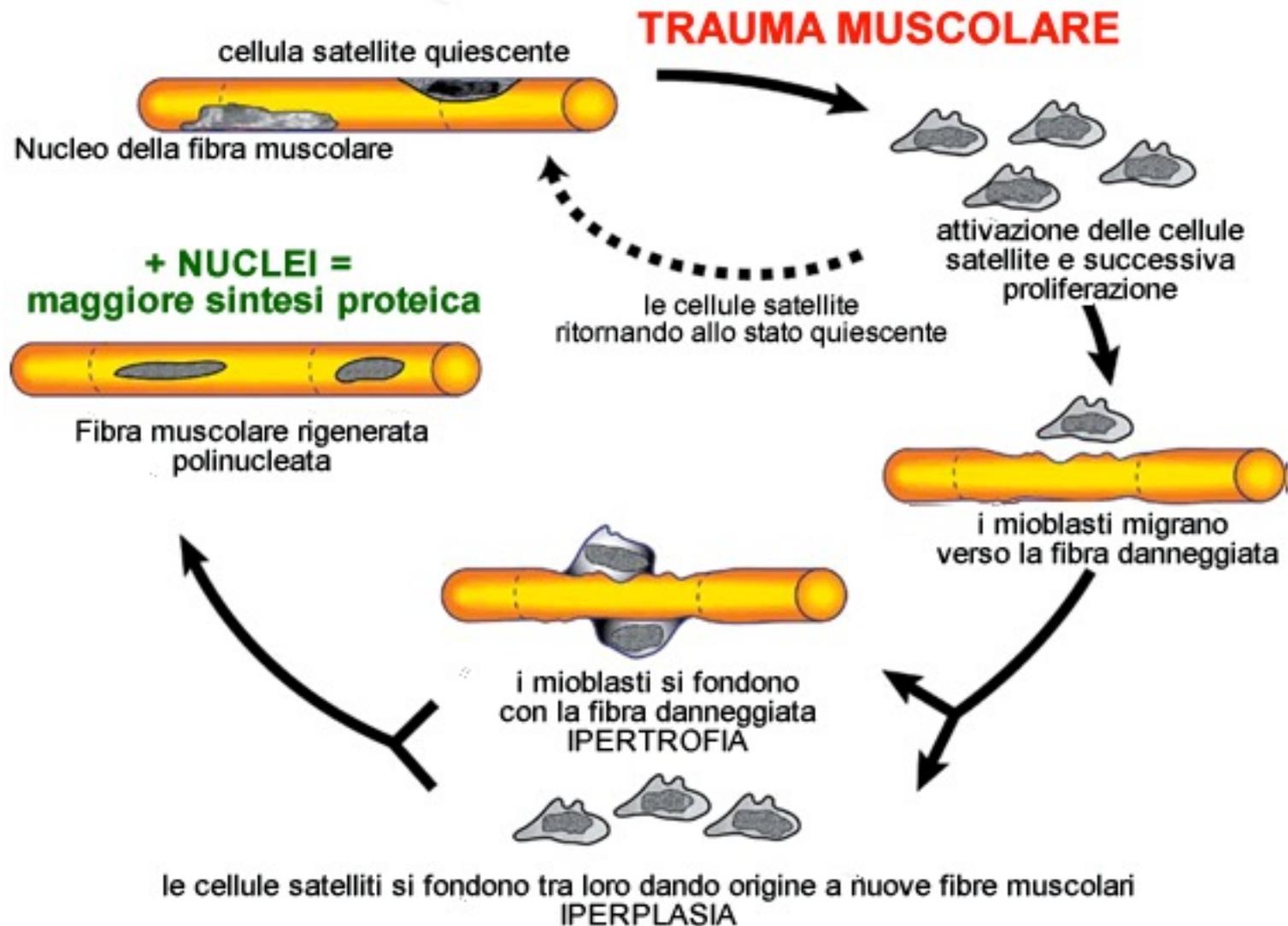
La cellula satellite



Le cellule satelliti sono piccole cellule che si trovano nella parte esterna della fibra muscolare

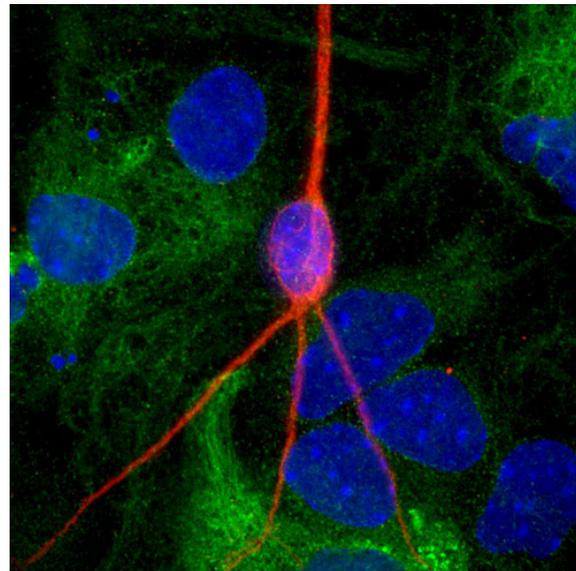
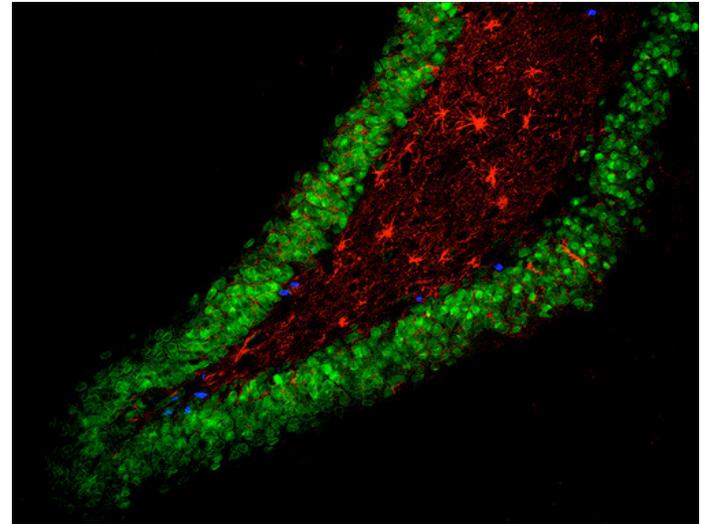
Contribuisco all'accrescimento postnatale del muscolo ma nell'adulto rimangono quiescenti fin quando non si attivano in seguito a un trauma

Il processo di rigenerazione muscolare



Neural stem cells

- They are located in:
 - *Subventricular zone* lining the lateral ventricles, where they give rise to newly-born neurons that migrate to the olfactory bulb via the rostral migratory stream
 - *Subgranular zone*, part of the dentate gyrus of the hippocampus
- Neural stem cells (also called Neural precursor cells) give rise to neurons, oligodendrocytes, and astrocytes
- (multipotent stem cells)



Top: Section of the hippocampus, blue dots are neural stem cells

Left: Mature neuron (red)

© CIRM

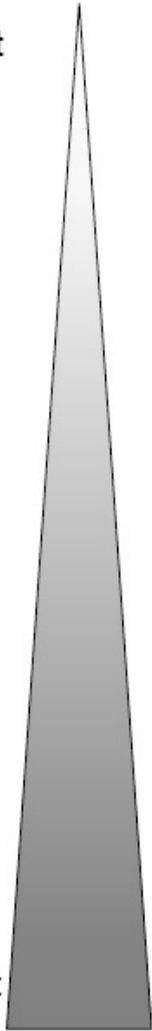
Tecniche di riprogrammazione

Le principali strategie di riprogrammazione fino ad oggi utilizzate sono:

- il trasferimento nucleare,
- la fusione cellulare,
- la riprogrammazione mediante estratti cellulari,
 - la riprogrammazione diretta tramite l'espressione forzata di un cocktail di fattori di trascrizione.

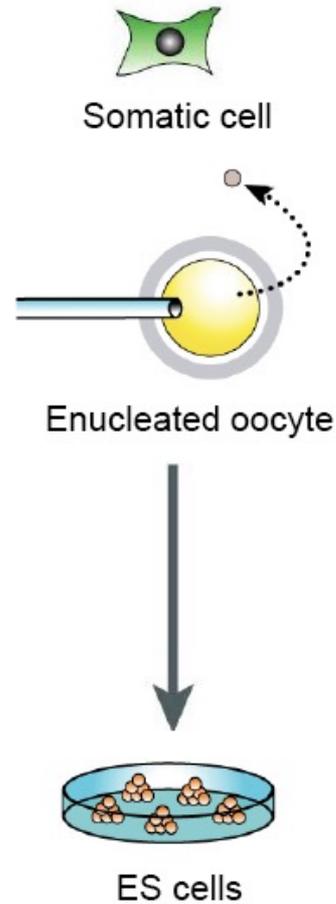
Developmental potential

Unipotent

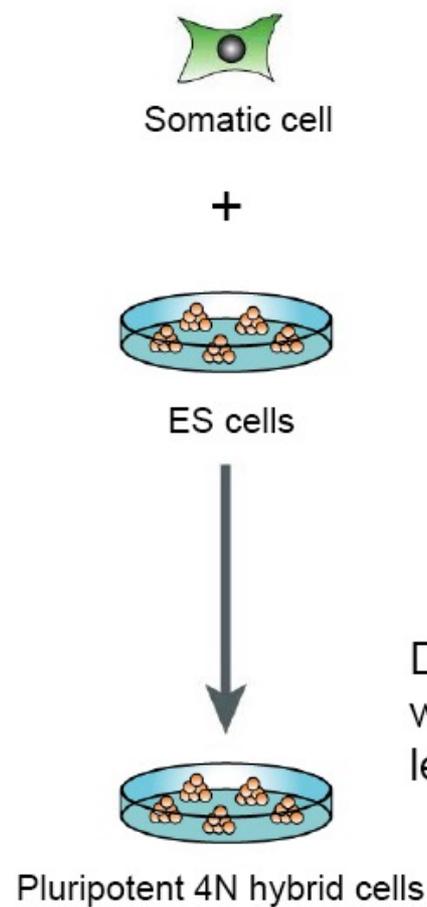


Pluripotent

Nuclear Transfer



Cell Fusion

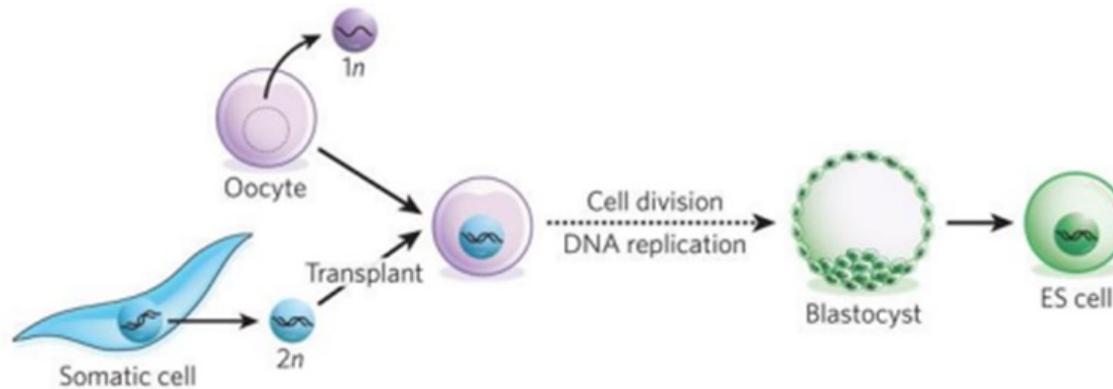


Goals of reprogramming:

- understand mechanisms
- apply to human system for therapy

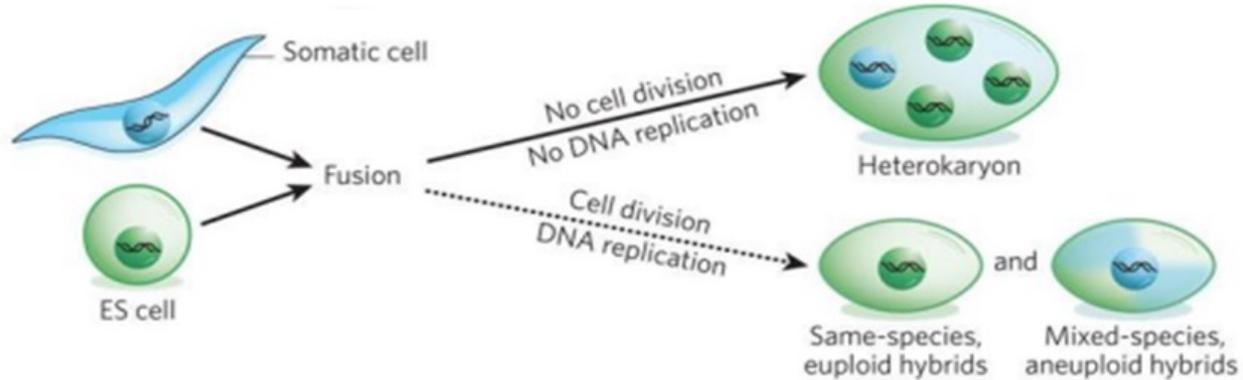
Direct reprogramming would potentially have less limitations.

Trasferimento nucleare



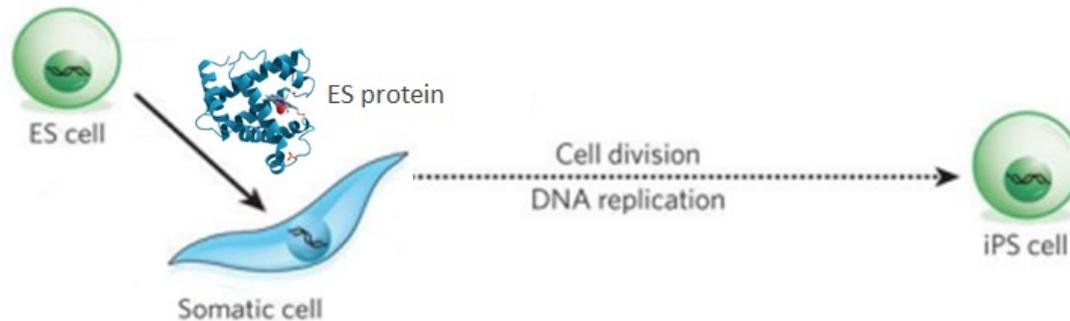
Comporta il trasferimento del nucleo di una cellula diploide (set completo di cromosomi appaiati) in un ovocita enucleato

Fusione cellulare



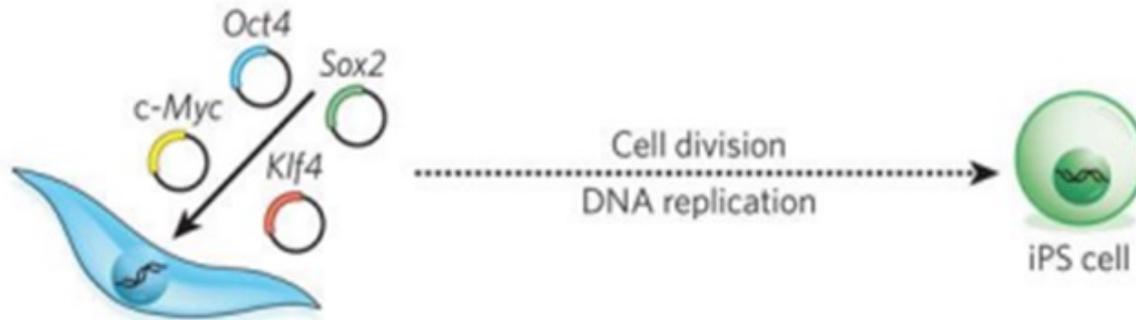
Le cellule staminali pluripotenti hanno una capacità intrinseca di riprogrammazione nucleare di cellule somatiche utilizzando la fusione cellulare ottenendo anche ES

Riprogrammazione mediata da estratti cellulari



La tecnica prevede la permeabilizzazione delle cellule somatiche per introdurre estratti proteici delle ES

Trasduzione di fattori di trascrizione

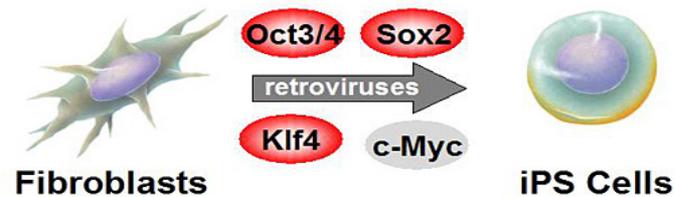


Si ipotizzò che l'espressione ectopica di fattori di trascrizione delle cellule ES, sarebbe stata sufficiente per conferire le caratteristiche tipiche delle cellule staminali a cellule terminalmente differenziate che permisero di produrre le iPS

iPS

Cellule somatiche convertite in una linea cellulare pluripotente tramite l'induzione dell'espressione di fattori specifici.

Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells



Mouse iPS cells reported in 2006

Human iPS cells reported in 2007

Yamanaka

- Medico chirurgo ortopedico giapponese che studiava lesioni incurabili del midollo spinale;
- Torna alla ricerca di base per trovare una cura;
- Studia un nuovo protocollo per riprogrammare le cellule somatiche a staminali;
- Parte da 100 geni con funzione nota di mantenimento della pluripotenza ed espressi in modo specifico nelle cellule staminali embrionali;
 - Attraverso la letteratura e la bioinformatica seleziona 24 geni candidati, che hanno un ruolo centrale nel mantenimento della pluripotenza nelle ESC;



→ **questi fattori sono in grado di revertire la differenziazione?**

Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

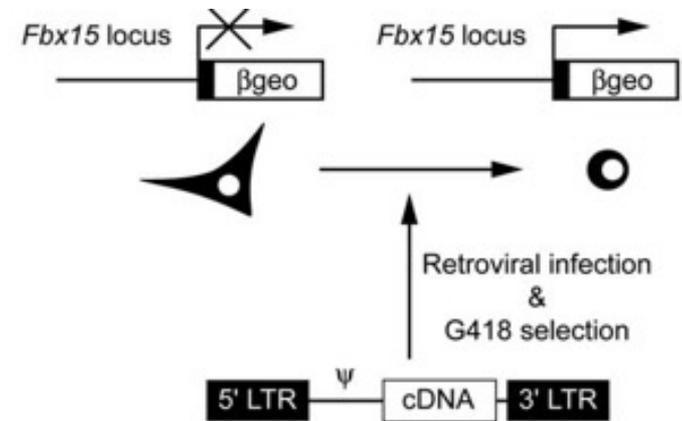
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

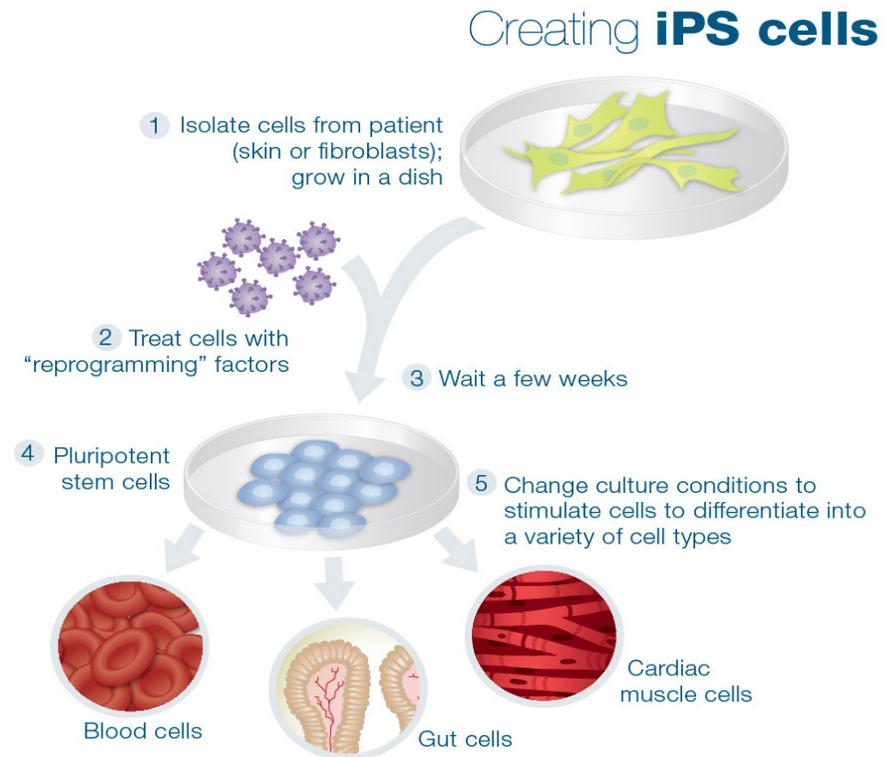
DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024

Disegno sperimentale

- Utilizza cellule MEF (Mouse Embryonic Fibroblast);
- Fbx15 è un fattore espresso da tutte le cellule staminali embrionali, fondamentale per il mantenimento della pluripotenza. Quindi usa la sua espressione come indicatore di staminalità delle cellule;
 - Inserisce nel gene Fbx15 una cassetta β geo (una fusione dei geni per la β -galattosidasi e la resistenza alla neomicina) per ricombinazione omologa;
 - La cassetta β geo permette di visualizzare le cellule che esprimono Fbx15 in quanto sono resistenti a G418 (neomicina) e variano il loro colore in blu (β -galattosidasi).



Lo stesso Yamanaka ha poi scoperto che lo stesso cocktail di fattori trascrizionali per generare iPSC è sia utilizzabile a partire da altre cellule somatiche murine sia applicabile alle cellule somatiche umane.



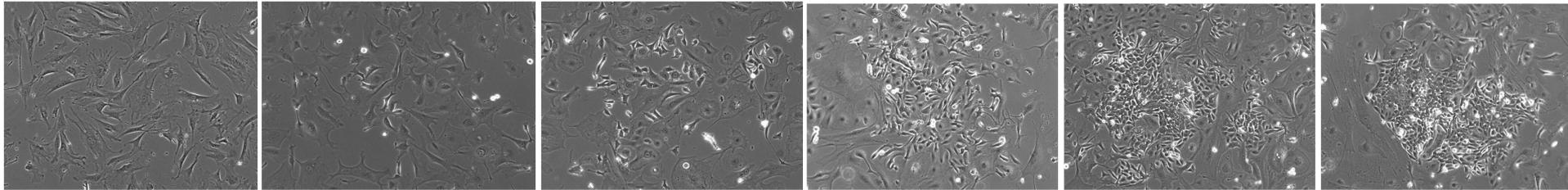
Induced pluripotent stem cells (iPS cells)

genetic reprogramming

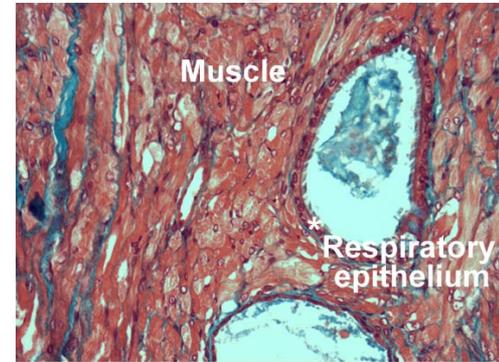
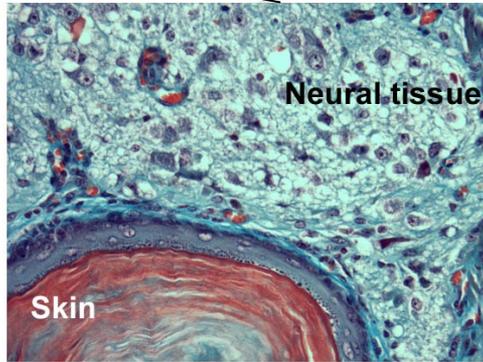
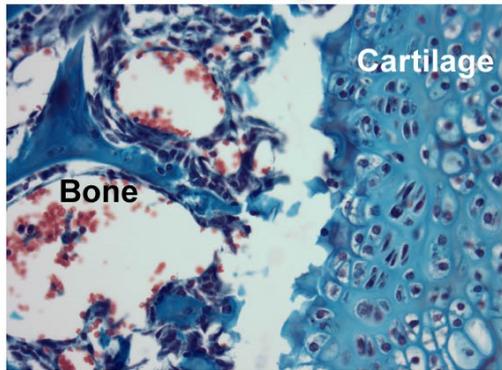


cell from the body (skin)

pluripotent stem cell (iPS)



differentiation



Caratteristiche delle iPSC

Le iPSC mostrano caratteristiche simili alle cellule staminali embrionali:

- **Stessa morfologia**
- Stesse proprietà proliferative
- Stesso tasso di divisione cellulare

Tuttavia ci sono evidenze che a livello molecolare siano presenti differenze significative: integrità genomica, stabilità epigenetica, espressione dell'RNA codificante e non-codificante.

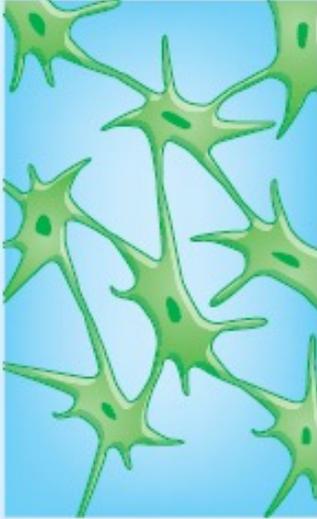
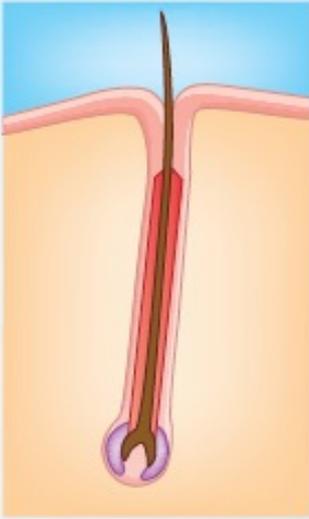
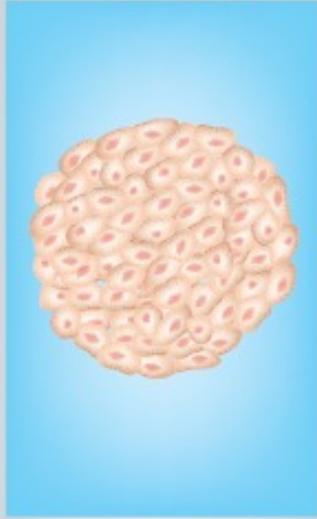
Pathway dei 4 fattori

C-Myc e Klf4 sono due fattori trascrizionali che modificano la struttura della cromatina permettendo l'attività di Sox2 e Oct4. Inoltre, sono entrambi fattori associati ai tumori, ma la loro azione nella generazione delle iPSC non è sostituibile con altri oncogeni.

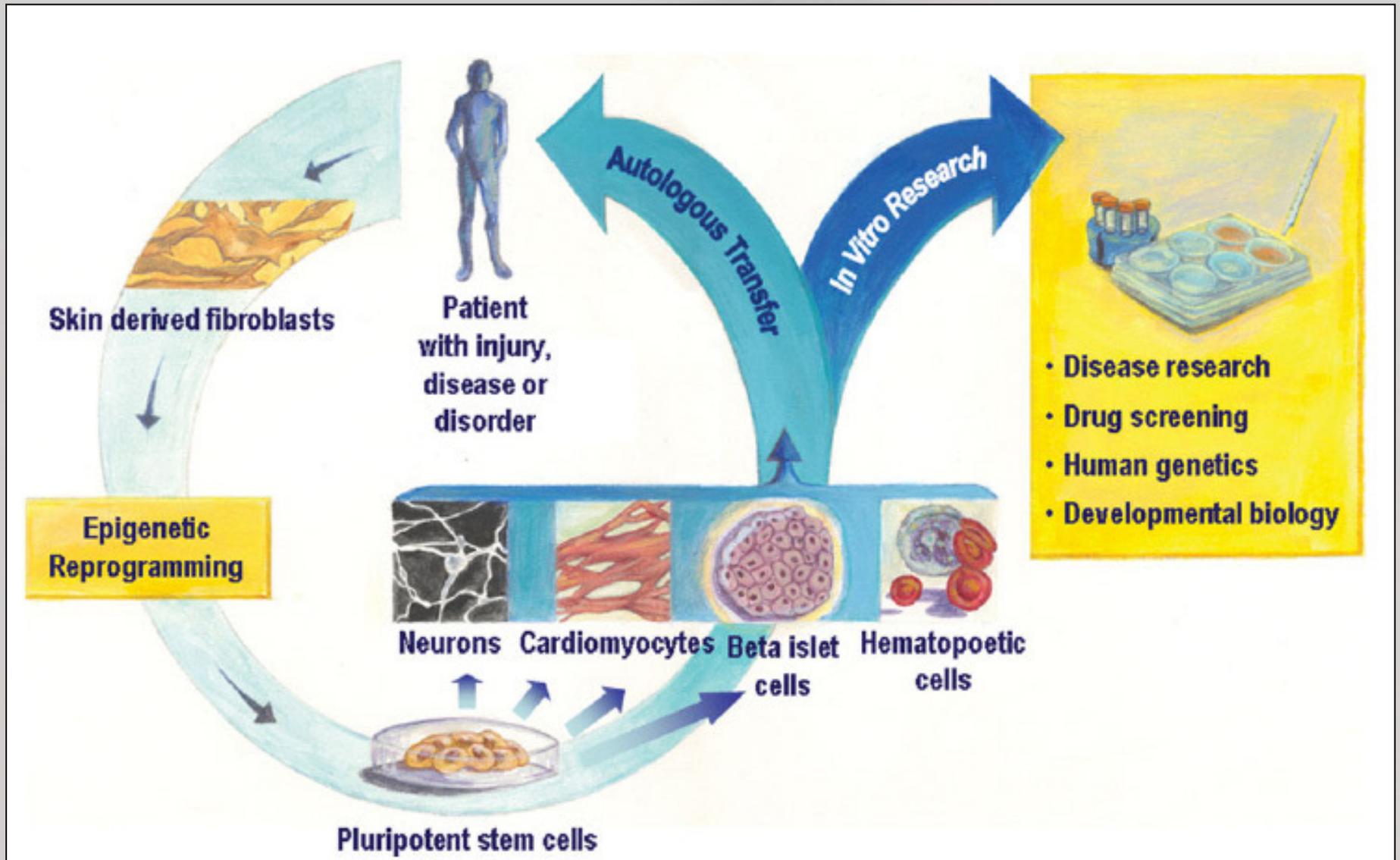
- **c-Myc**: forma un eterodimero con Max, un regolatore trascrizionale, che gli permette di legare efficientemente il DNA e avere funzione di attivatore trascrizionale. Si associa alle acetiltransferasi istoniche (HAT), e influenza molti target che aumentano la proliferazione e la trasformazione cellulare.
 - **Klf4**: fattore trascrizionale che può agire sia come attivatore che come repressore. Regola l'espressione di fattori di trascrizione chiave per lo sviluppo embrionale, oltre a svolgere un ruolo fondamentale nel mantenimento delle cellule ES e nella prevenzione del loro differenziamento.

- **Sox2**: fattore di trascrizione che forma un complesso trimetrico con Oct4 sul DNA e upregola l'espressione di numerosi geni coinvolti nello sviluppo embrionale e associati alla pluripotenza nelle cellule staminali embrionali.
 - **Oct4**: fattore di trascrizione in grado di legare uno specifico motivo ottamerico sul DNA (ATTTGCAT). É espresso a livello elevato nelle ESC, mentre l'espressione diminuisce gradualmente dopo la formazione dei corpi embrioidi. Inoltre sono stati rilevati alti livelli nelle cellule della corteccia, del bulbo olfattorio, dell'ippocampo e del cervelletto. Infine, sono stati scoperti numerosi pseudogeni, con attività di cancerogenesi.

Tipo cellulare di partenza per generare iPS

	Human fibroblasts	Human keratinocytes	Mouse neural progenitors
			
Endogenous gene expression	KLF4: low OCT4: no SOX2: no C-MYC: low	KLF4: hi OCT4: no SOX2: no C-MYC: hi	Klf4: low Oct4: no Sox2: yes c-Myc: hi
Efficiency of iPS generation with four factors	0.01%	1%	3.6%
Minimal factors for reprogramming	OCT4 KLF4 SOX2	OCT4 KLF4 SOX2	Oct4 Klf4 or c-Myc

In vitro disease modeling by iPS technology



Applicazioni in medicina

Le principali applicazioni nella medicina rigenerativa che i ricercatori stanno testando sono:

- Patologie neurologiche, come morbo Parkinson, Corea di Huntington e malattie del motoneurone
- Diabete
 - Degenerazione maculare
 - Danni al midollo spinale
- Infarto del miocardio e altre patologie cardiache
 - Sclerosi multipla
 - Leucemia
 - Danni alla cartilagine e ai tendini

