

FROM  
STEM CELLS

TO  
iPSCs

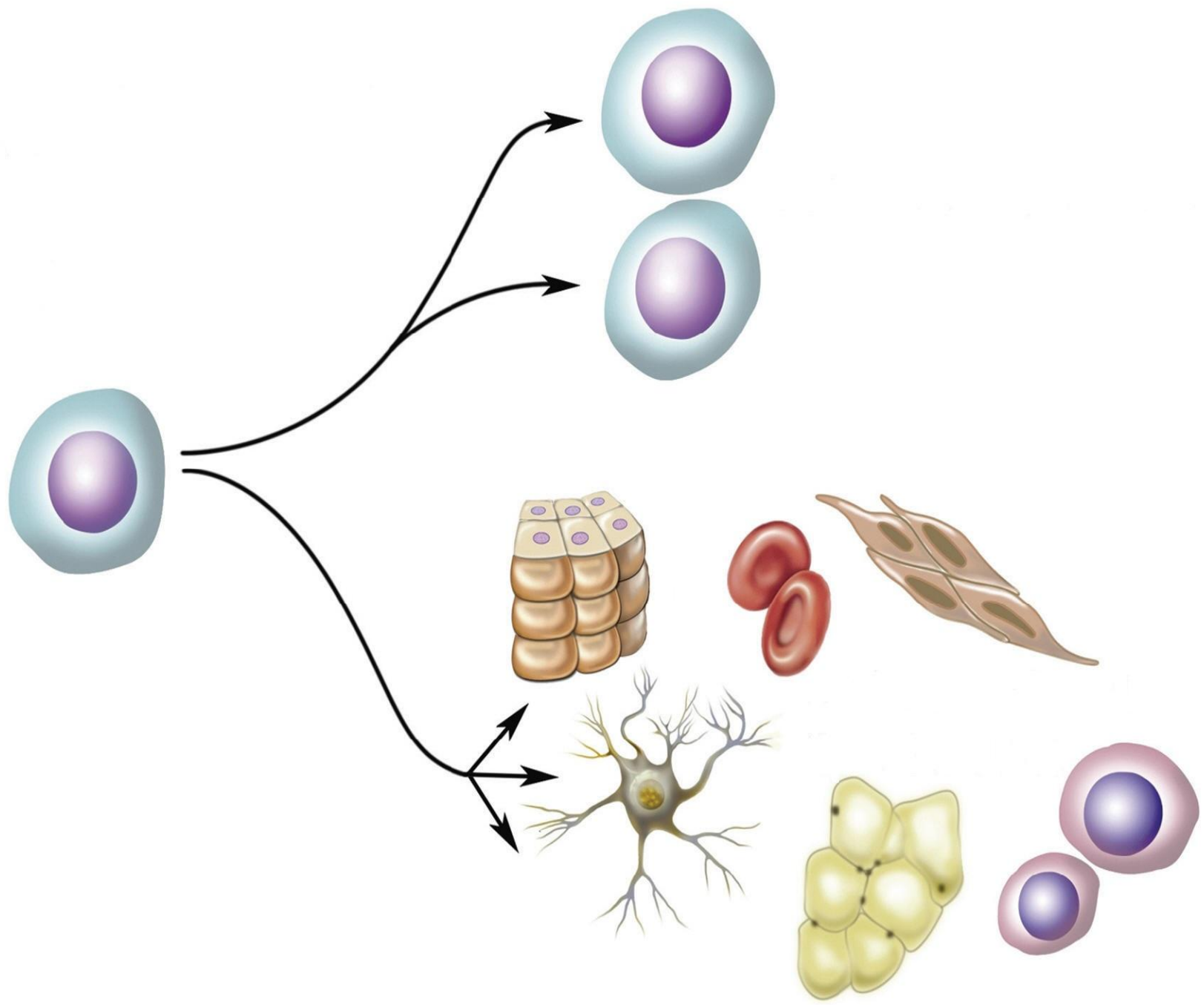
A cura di:

Pasquale Martucci  
Elisa Di Napoli  
Giovanni Tarantino  
Simone Micalizzi  
Filomena Petrella  
Daniela Vincenti

# CELLULE STAMINALI

Cellula non specializzata presente in tutti gli organismi viventi, dotata essenzialmente di due caratteristiche:

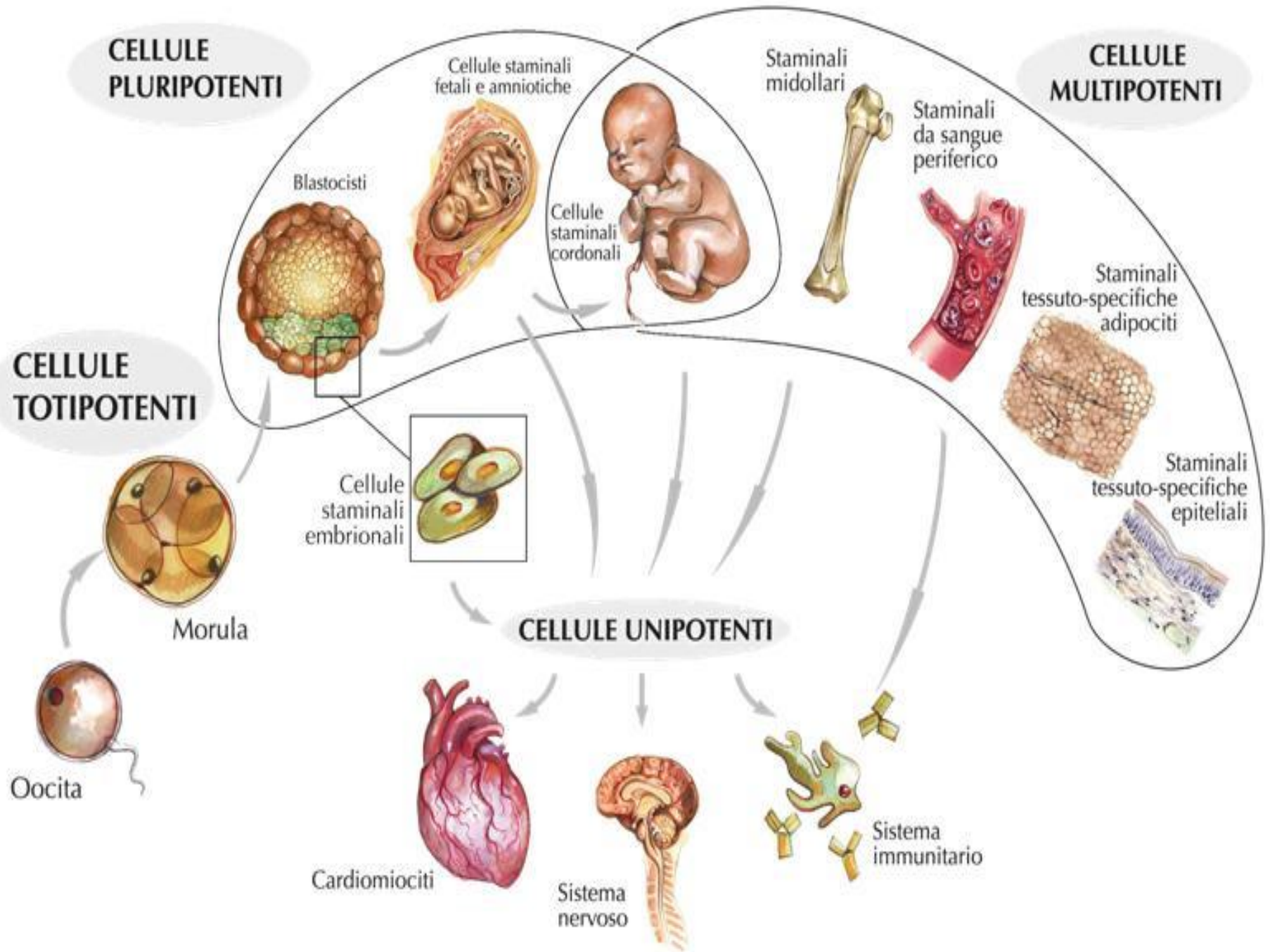
- a) **autorinnovamento**: capacità di generare una cellula indifferenziata esattamente uguale alla cellula madre attraverso numerosi cicli cellulari;
- b) **potenza**: capacità di **differenziarsi** in tipi cellulari specializzati.



# La potenza differenziativa

Le staminali sono le uniche cellule in grado di compiere una divisione asimmetrica, cioè di generare due cellule figlie diverse tra loro. Una uguale alla cellula madre, quindi ancora staminale, mentre l'altra sarà in grado di differenziarsi in un dei 200 tipi cellulari specializzati presenti nell'uomo. In base alle loro potenzialità in termini di differenziazione, le cellule staminali possono definirsi:

- **Totipotenti:** possono dare vita a tutti i tessuti e ad ogni tipologia di cellula, comprese quelle degli annessi embrionali;
- **Pluripotenti :** quelle che possono specializzarsi in tutti i tipi di cellule degli individui adulti ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embrionali;
- **Multipotenti:** sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule;
- **Unipotenti:** possono generare solamente un tipo di cellule, specializzate e funzionali al tessuto da costruire o rigenerare



**CELLULE PLURIPOTENTI**

**CELLULE MULTIPOTENTI**

**CELLULE TOTIPOTENTI**

**CELLULE UNIPOTENTI**

Oocita

Morula

Blastocisti

Cellule staminali fetali e amniotiche

Cellule staminali cordonali

Staminali midollari

Staminali da sangue periferico

Staminali tessuto-specifiche adipociti

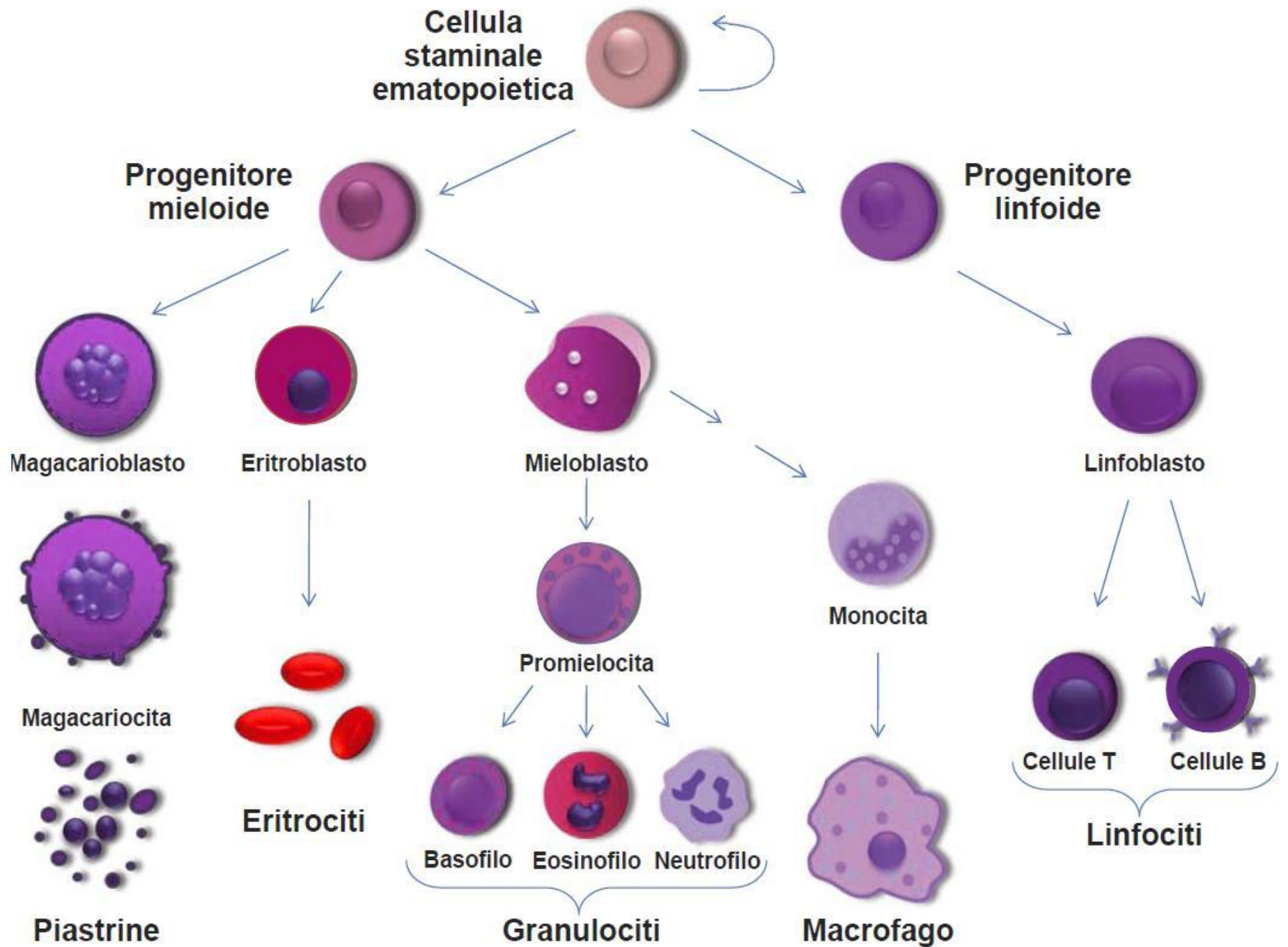
Staminali tessuto-specifiche epiteliali

Cellule staminali embrionali

Cardiomiociti

Sistema nervoso

Sistema immunitario



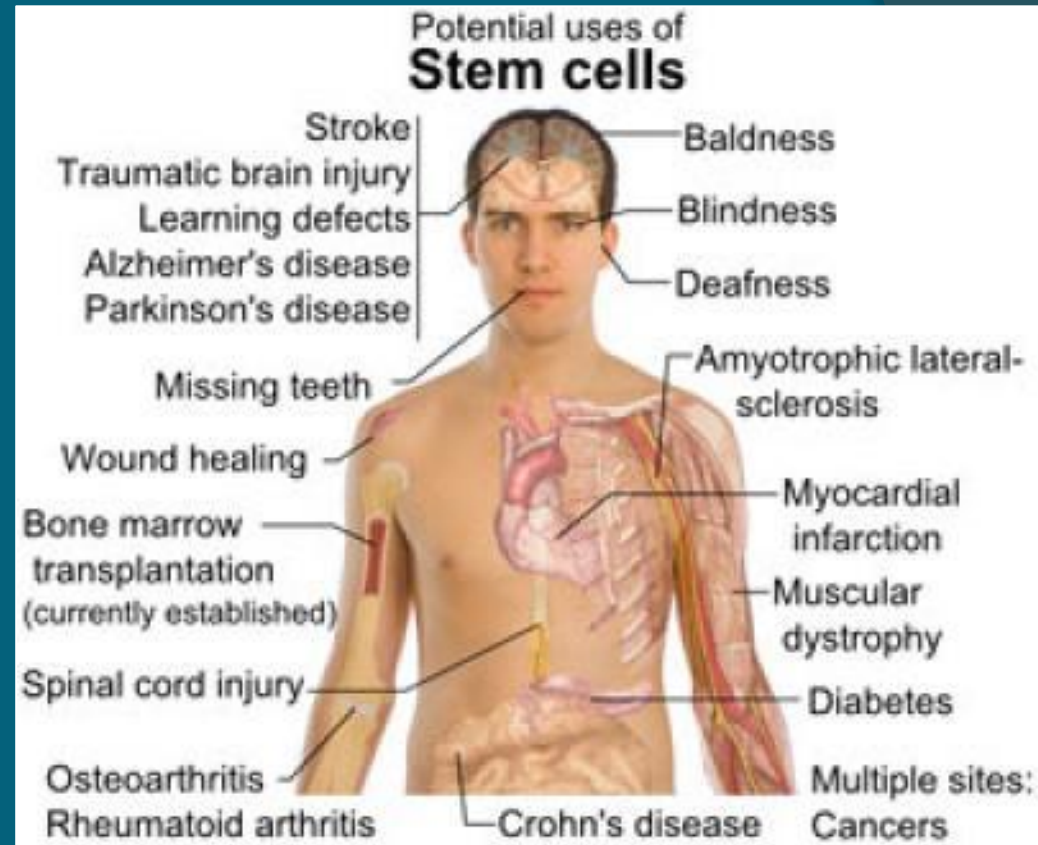
# Utilizzi delle cellule staminali

## RICERCA SCIENTIFICA

Le cellule staminali sono la chiave per chiarire i dettagli fini dello sviluppo embrionale

## MEDICINA RIGENERATIVA

Le cellule staminali, trattate in maniera adeguata, potrebbero essere la migliore soluzione per la ricostruzione di tessuti e organi danneggiati da malattie, traumi o invecchiamento.



# Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)

Yamanaka, nel 2006, dimostrò con successo che solo 4 fattori (denominati successivamente Yamanaka factors) erano necessari per 'riprogrammare' una cellula adulta. Il processo di riprogrammazione consiste nella modificazione di quattro geni del genoma di una cellula adulta al fine di ripristinare la potenzialità staminale.

Sono state così generate le "*Induced Pluripotent Stem Cell*" (IPSC). Al contrario delle staminali adulte ed embrionali, le IPSC non esistono in natura, ma sono generate artificialmente in laboratorio.





# EVOLUZIONE NELLA SCOPERTA iPSC

- 2006 → The first iPSC
- 2007 → Human iPSC arrive
- 2008 → Rat model of Parkinson's
- Small molecule boost efficiency
- 2009 → iPSC into beating heart cells
- iPSC make mice
- 2013 → First retina transplantation  
derivated from iPSC
- 2016 → Creation of integumentary system

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

Kazutoshi Takahashi<sup>1</sup> and Shinya Yamanaka<sup>1,2,\*</sup>

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

<sup>2</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

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

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024

### SUMMARY

Differentiated cells can be reprogrammed to an embryonic-like state by transfer of nuclear contents into oocytes or by fusion with embryonic stem (ES) cells. Little is known about factors that induce this reprogramming. Here, we demonstrate induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic or adult fibroblasts by introducing four factors, Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4, under ES cell culture conditions. Unexpectedly, Nanog was dispensable. These cells, which we designated iPSC (induced pluripotent stem) cells, exhibit the morphology and

or by fusion with ES cells (Cowan et al., 2005; Tada et al., 2001), indicating that unfertilized eggs and ES cells contain factors that can confer totipotency or pluripotency to somatic cells. We hypothesized that the factors that play important roles in the maintenance of ES cell identity also play pivotal roles in the induction of pluripotency in somatic cells.

Several transcription factors, including Oct3/4 (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000), Sox2 (Avilion et al., 2003), and Nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003), function in the maintenance of pluripotency in both early embryos and ES cells. Several genes that are frequently upregulated in tumors, such as *Stat3* (Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998), *E-Ras* (Takahashi et al., 2003), *c-myc* (Cartwright et al., 2005), *Klf4* (Li et al., 2005), and

# iPSC

## Ipotesi di lavoro

L'ipotesi alla base è che i fattori di trascrizione che contribuiscono al mantenimento dell'identità di cellula staminale giochino un ruolo fondamentale nell'induzione di pluripotenza nelle cellule somatiche.

# iPSC

## Selezione dei fattori

L'induzione allo stato di pluripotenza è dimostrata come resistenza dei geni al G418, un antibiotico che lega la subunità 80S del ribosoma bloccando la fase di allungamento della sintesi proteica sia in cellule procariote che eucariote.

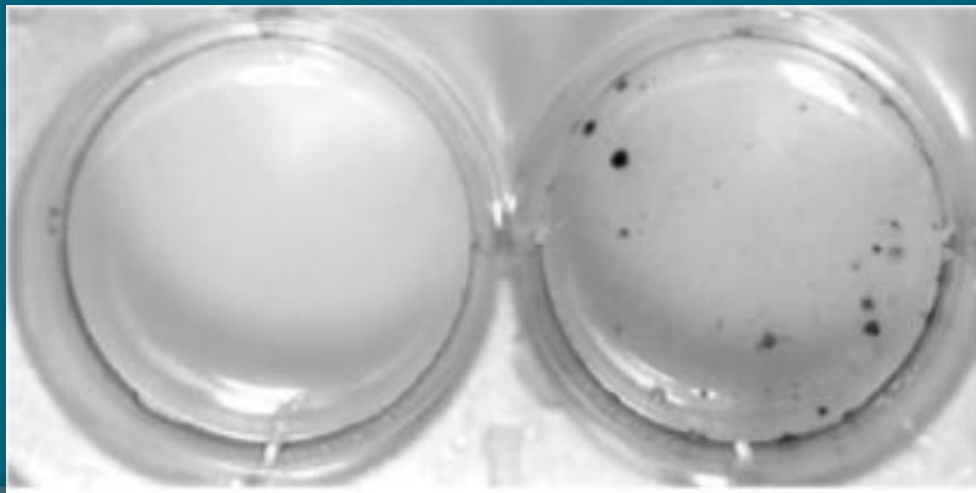
# iPSC

## Selezione dei fattori

Introduzione di 24 geni nei fibroblasti embrionali di topo (MEFs)

Nessun gene inserito singolarmente, attraverso trasduzione retrovirale, genera colonie.

Al contrario la trasduzione di tutti i 24 candidati simultaneamente genera 22 colonie resistenti al G418.



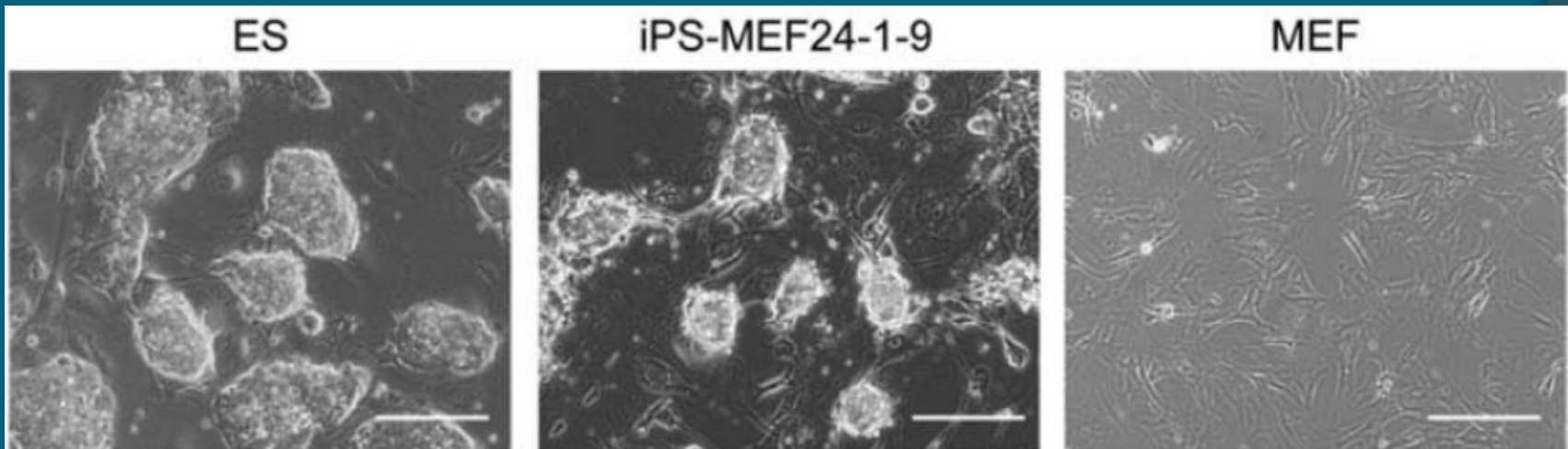
# iPSC

## Selezione dei fattori

Delle 22 colonie formatesi, 5 mostrano una morfologia simile alle cellule staminali embrionali (forma rotonda, nucleoli larghi, scarso citoplasma).

Ripetendo l'esperimento su 29 colonie, il 75% aveva:

- stessa morfologia delle ES
- stesse proprietà proliferative
- stesso tempo di duplicazione .



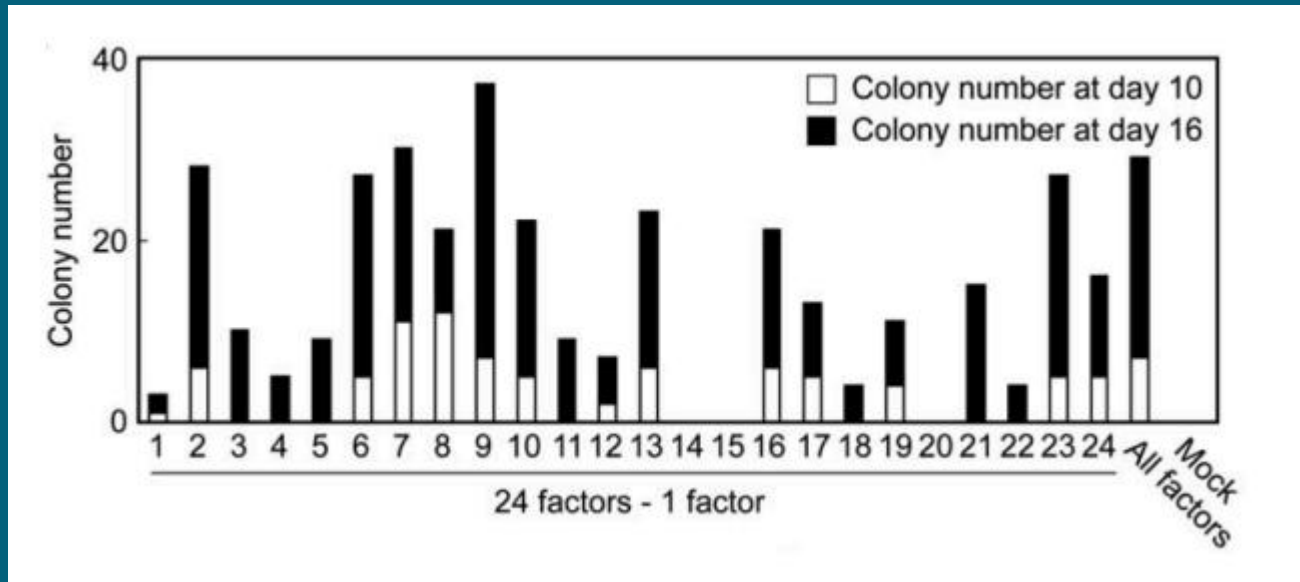
# iPSC

## Selezione dei fattori

*“We designated these cells iPS-MEF24  
for pluripotent  
stem cells induced from MEFs by 24 factors”*

# iPSC

## Selezione dei fattori



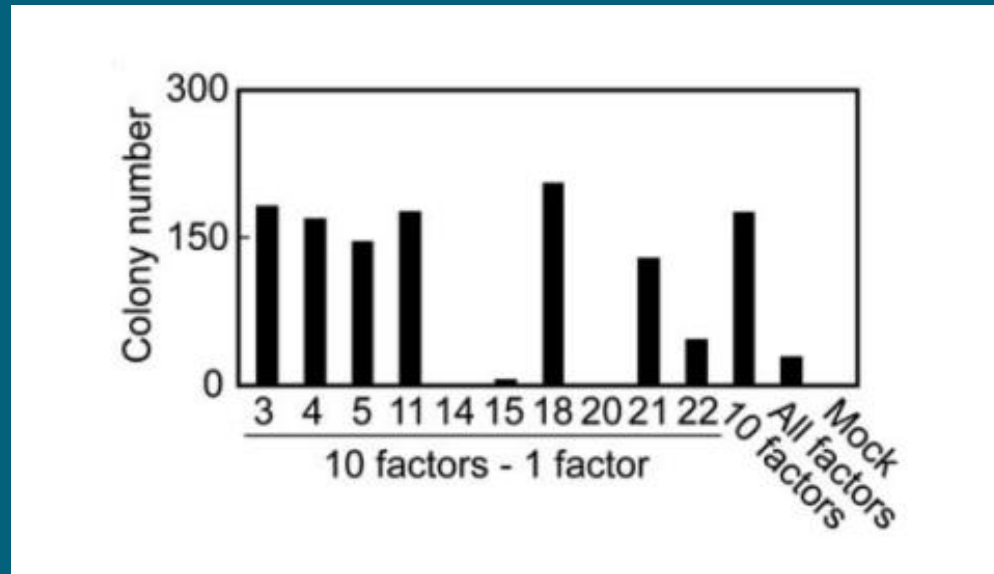
Ulteriore selezione eliminando singolarmente i fattori.

10 geni non avevano formato colonie a 10 giorni dall'esperimento, o ne avevano formate pochissime dopo 16 giorni



# iPSC

## Selezione dei fattori

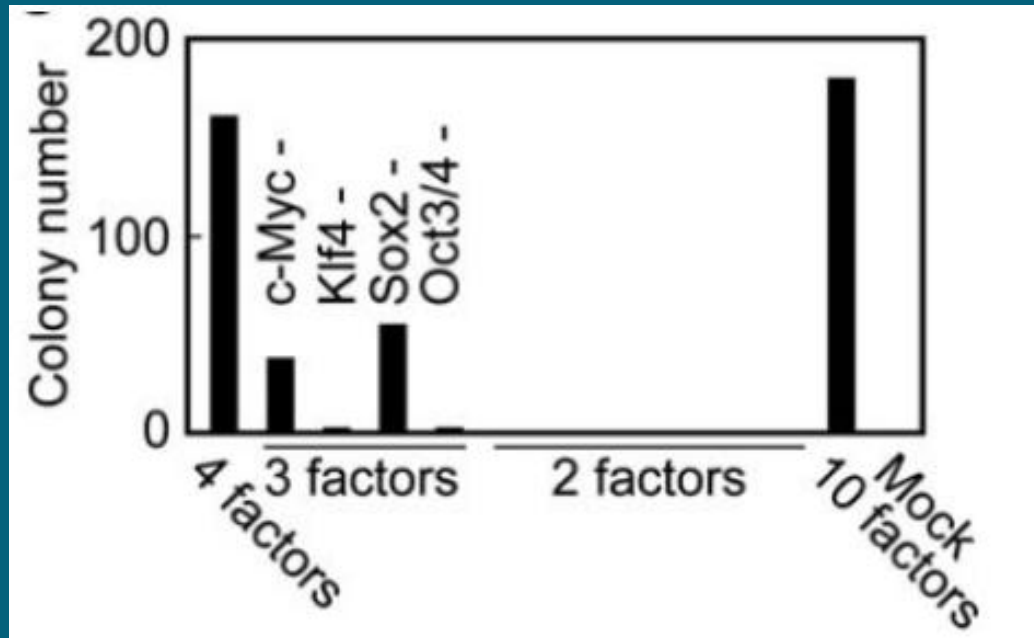


Si nota che:

- la combinazione di questi 10 geni porta alla formazione di molte più colonie rispetto alla trasduzione dei 24 i geni.
- nessuna colonia formatasi rimuovendo il fattore 14 (Oct3/4) e il fattore 20 (Klf4)
- si erano formate poche colonie togliendo il fattore 15(Sox2)
- togliendo il gene c-Myc si ottiene una colonia, ma con morfologia diversa dalle ES
- la rimozione degli altri 6 fattori non giocava un ruolo fondamentale sul numero di colonie formate

# iPSC

## Selezione dei fattori

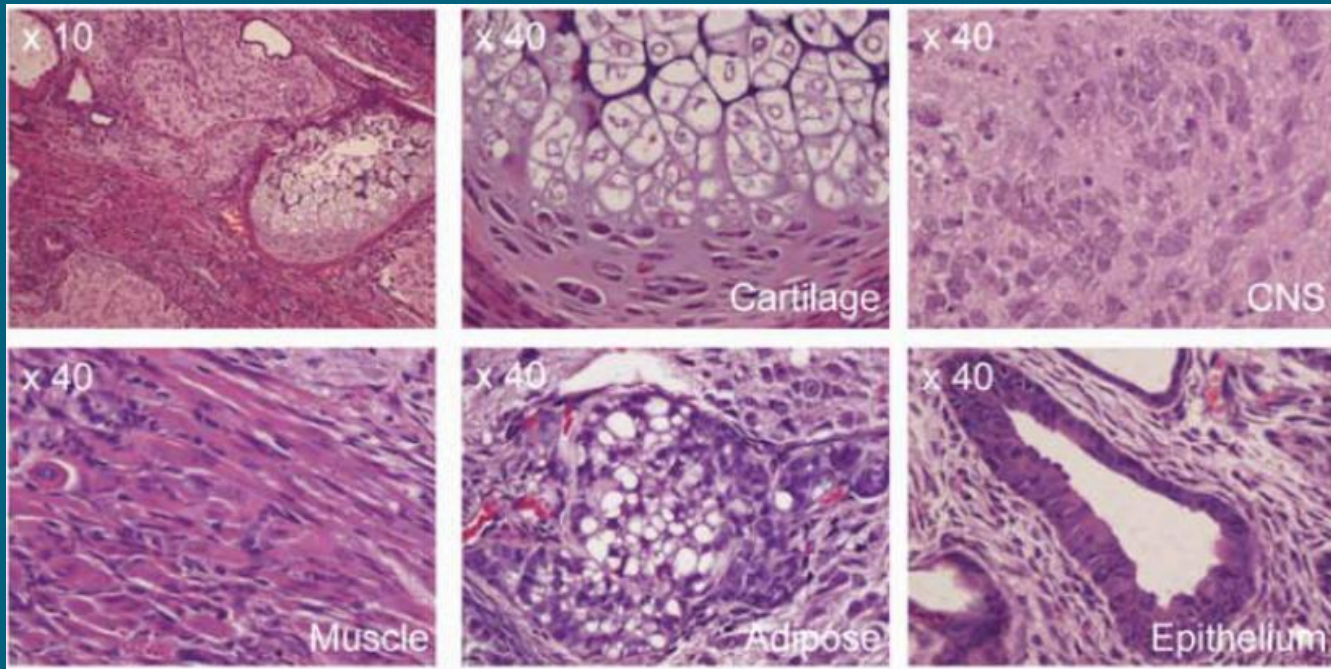


Si nota che:

- la combinazione dei quattro geni ha prodotto un numero di colonie simile a quello osservato con 10 geni
- combinando solo 2 di questi 4 fattori non si sono prodotte colonie
- combinando 3 fattori in due possibili accoppiamenti (octsox e myc oppure klf e myc), si è generata una colonia ristretta in ciascun caso

# Verifica della pluripotenza

Il test sulla pluripotenza viene effettuato mediante iniezione sottocutanea nei topi, inducendo la formazione di teratocarcinomi. Il Teratoma è una forma tumorale che si presenta come una massa abbozzata di organismo umano che presenta una distinzione dei più svariati tipi di tessuto, uno ammassato sull'altro.

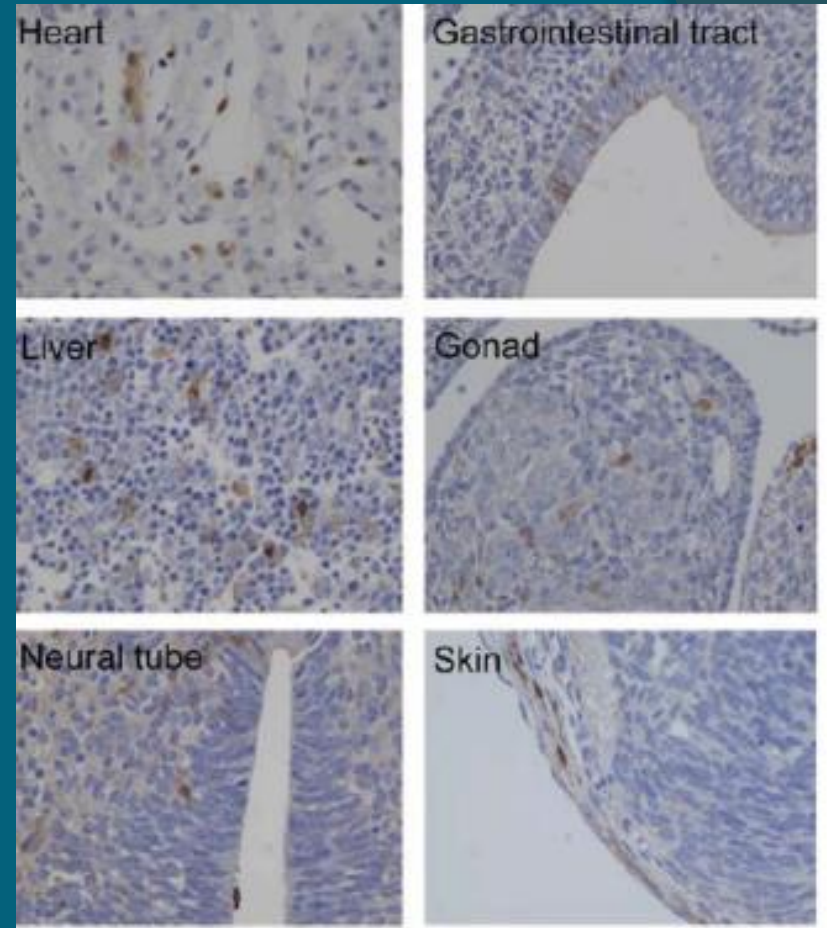


# iPSC derivanti da fibroblasti adulti della coda di topo (TTFs)

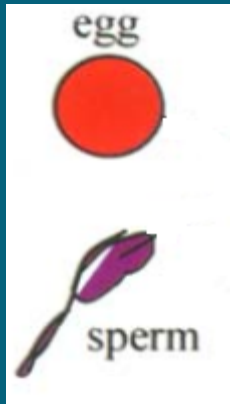
I 4 fattori selezionati vengono introdotti nei fibroblasti della coda di 4 topi di 7 settimane (adulti) producendo quindi le iPS-TTf.

Le iPS-TTF vengono inserite nelle blastocisti tramite microiniezioni.

Analisi istologiche hanno successivamente confermato che le iPS hanno contribuito alla formazione di 3 "layer" germinali, da cui hanno attinto i tessuti.

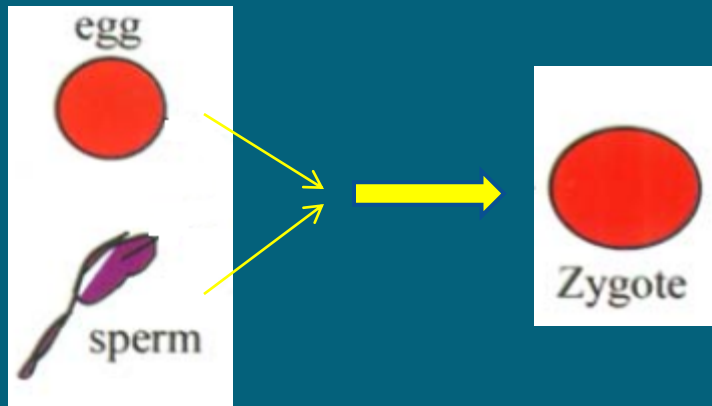


# Isolamento e differenziazione di cellule staminali embrionali *in-vitro*



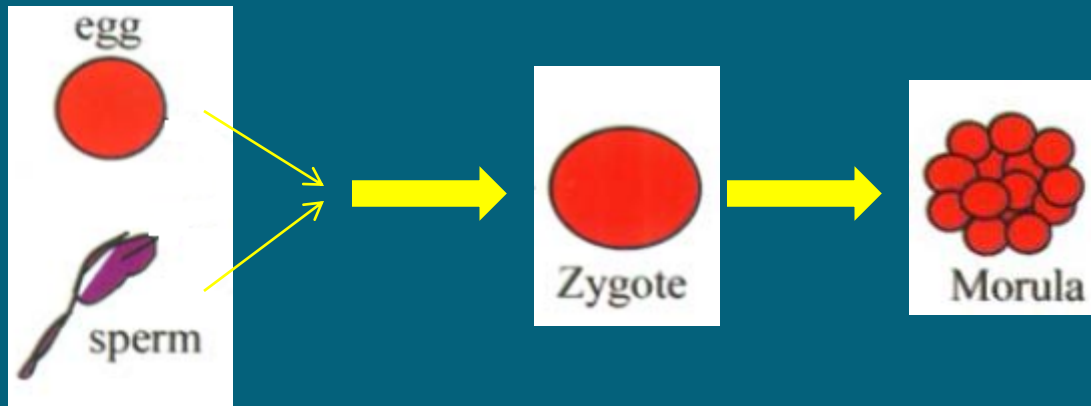
Nell'uomo, la fecondazione di un ovulo da uno spermatozoo genera uno **Zigote**.

# Isolamento e differenziazione di cellule staminali embrionali *in-vitro*



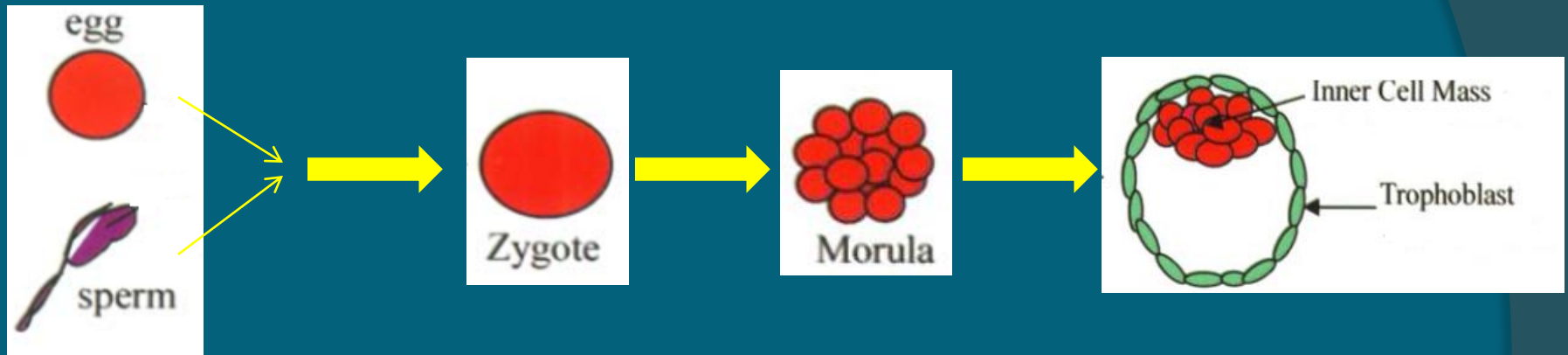
Ore più tardi lo zigote comincia a dividersi. Dal terzo al quarto giorno l'embrione si sviluppa in un agglomerato di dodici o più cellule chiamato **Morula**.

# Isolamento e differenziazione di cellule staminali embrionali *in-vitro*



Dopo diverse divisioni, le cellule della morula cominciano a specializzarsi e formare una sfera cava di cellule chiamata **Blastocisti**.

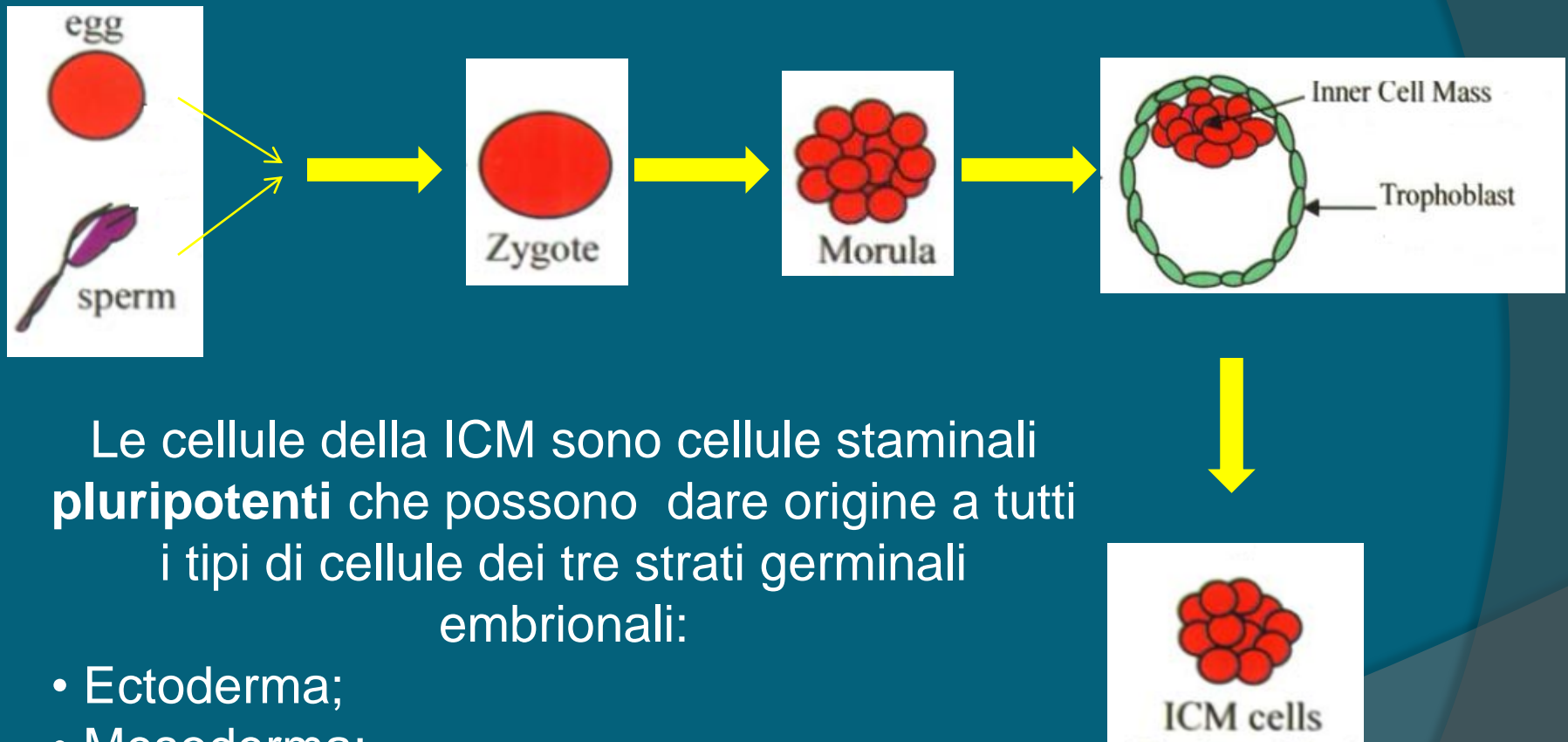
# Isolamento e differenziazione di cellule staminali embrionali *in-vitro*



Lo strato esterno della blastocisti viene chiamato **Trofoblasto** (TE) e le cellule all'interno formano la **Massa Cellulare Interna** (ICM).



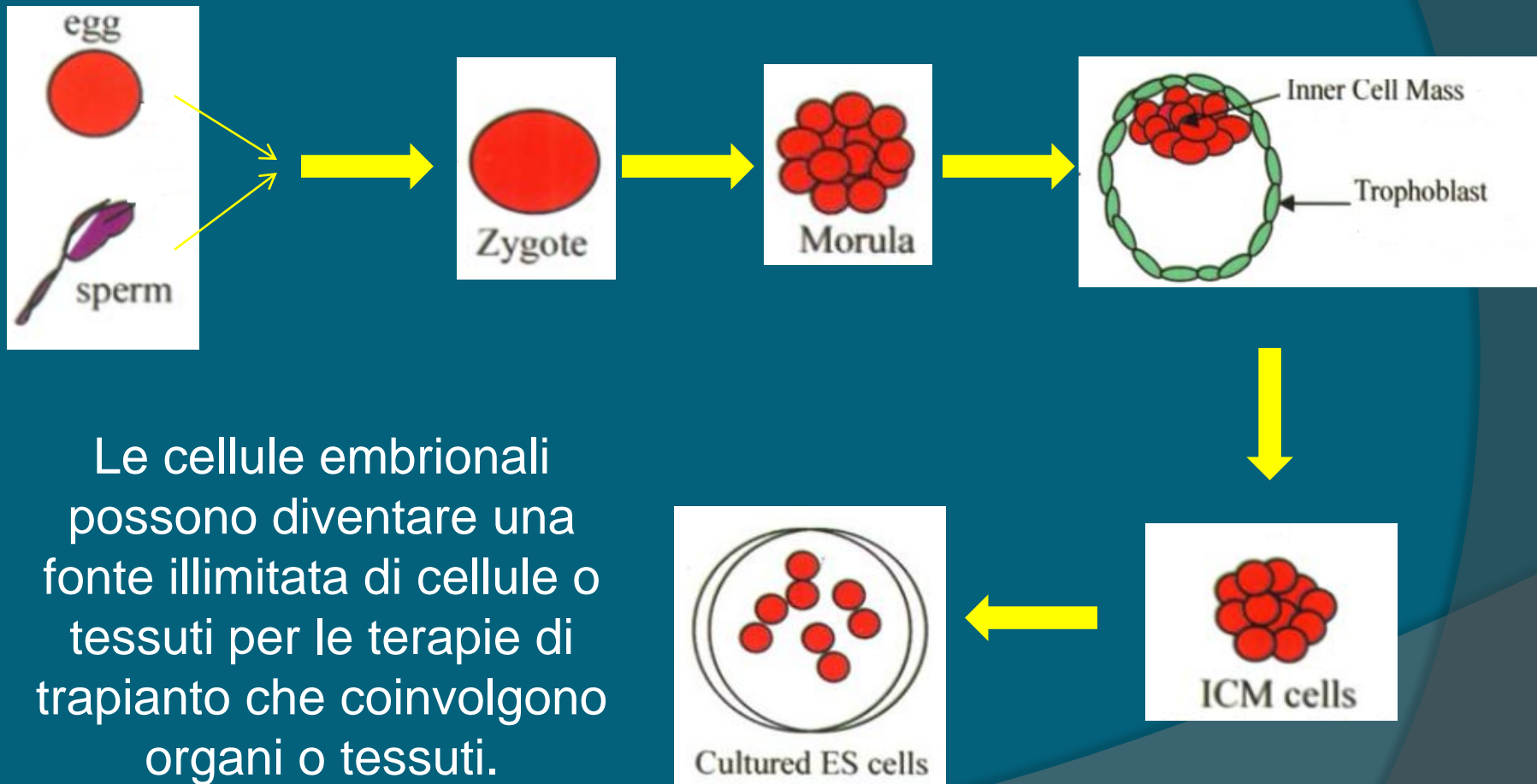
# Isolamento e differenziazione di cellule staminali embrionali *in-vitro*



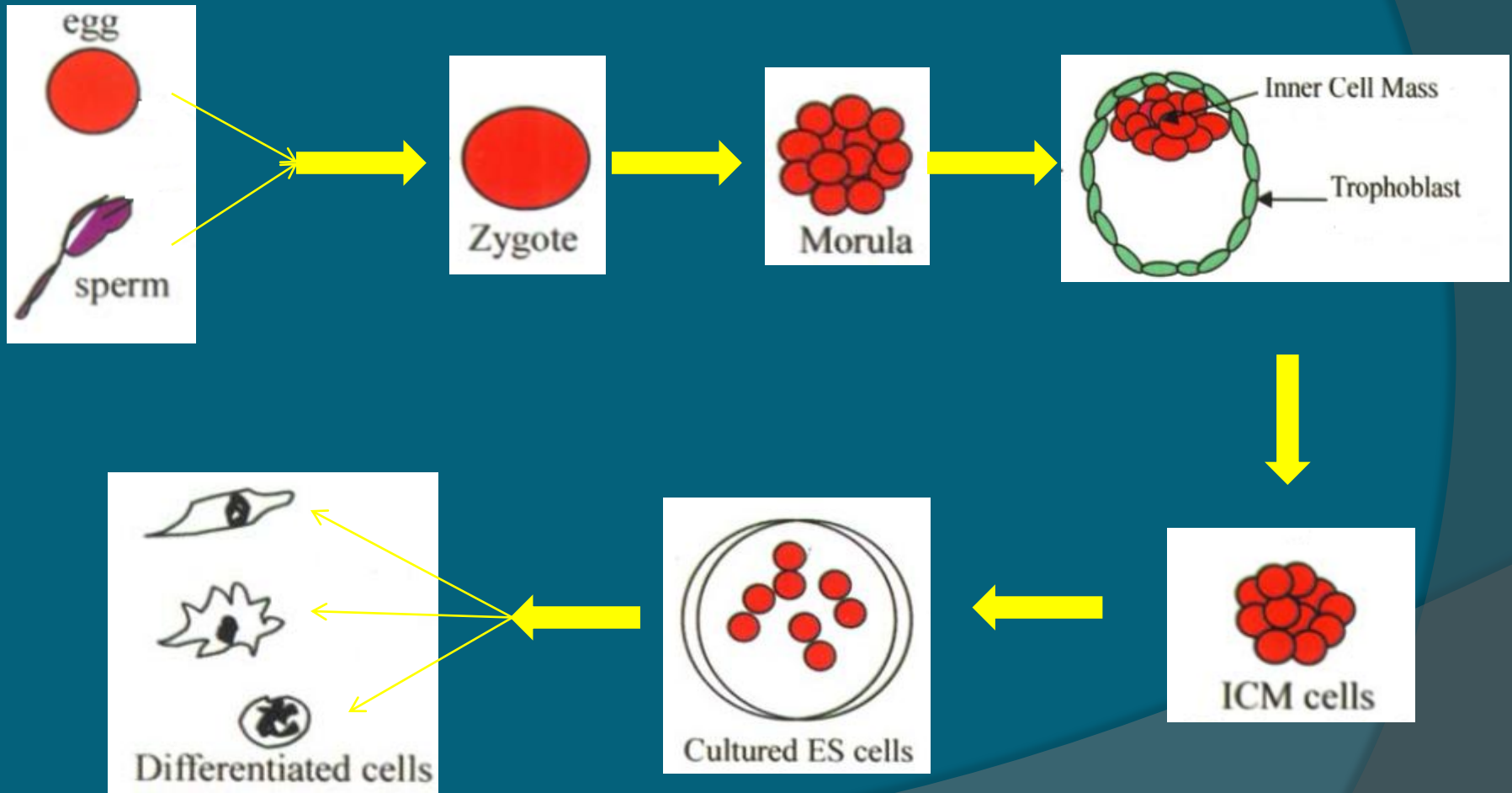
Le cellule della ICM sono cellule staminali **pluripotenti** che possono dare origine a tutti i tipi di cellule dei tre strati germinali embrionali:

- Ectoderma;
- Mesoderma;
- Endoderma.

# Isolamento e differenziazione di cellule staminali embrionali *in-vitro*



# Isolamento e differenziazione di cellule staminali embrionali *in-vitro*



# Fattori di trascrizione

Si parte da una qualsiasi cellula, generalmente una cellula che si può isolare dalla cute, il fibroblasto. Si inseriscono 4 geni - **Oct3/4**, **Sox2**, **Klf4**, **c-Myc** - e la cellula si trasforma in una cellula staminale pluripotente sostanzialmente identica ad una cellula staminale embrionale con il vantaggio che non producono una reazione di rigetto.

# Fattori di trascrizione

## Oct4

(octamer-binding transcription factor 4)

Oct4 è una proteina presente quasi esclusivamente in cellule ES. Durante lo sviluppo embrionale è presente inizialmente in tutti i blastomeri. Successivamente si restringe alla ICM e nel TE.

Un'analisi quantitativa ha rivelato che un alto livello di unità di Oct4 porta le ES a differenziarsi in mesoderma o endoderma, mentre quelli con un basso livello di Oct4 diventano cellule trofotodermali.

Cellule ES con un livello normale di Oct4 rimangono pluripotenti.

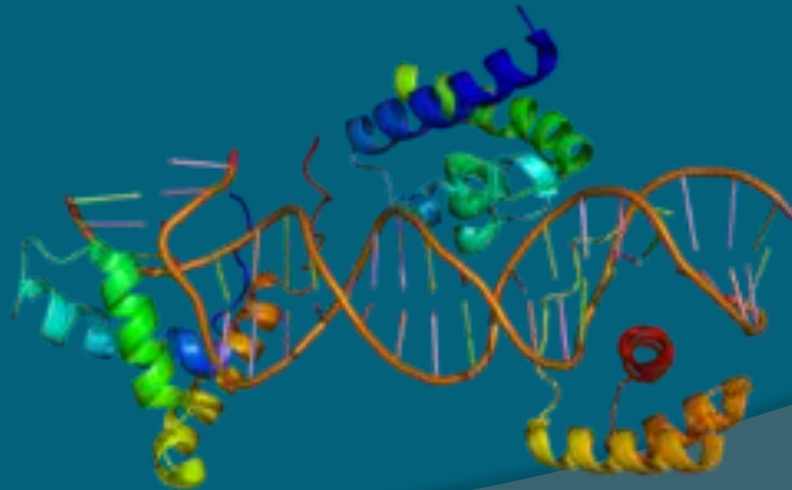


# Fattori di trascrizione

## SRY (Sox2)

(sex determining region Y)

La funzione di Sox2 nelle cellule embrionali è il mantenimento della pluripotenza e l'auto rinnovamento. Sox2 assieme a Oct4 co-occupano la regione dei geni coinvolti nella pluripotenza e differenziazione.

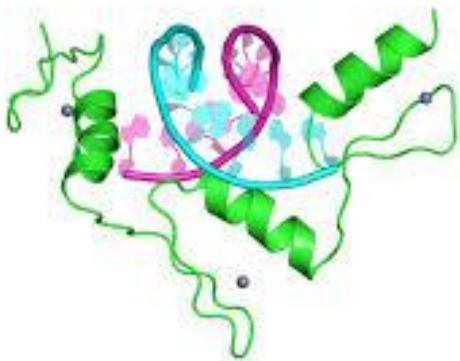


# Fattori di trascrizione

## Klf4 e c-Myc

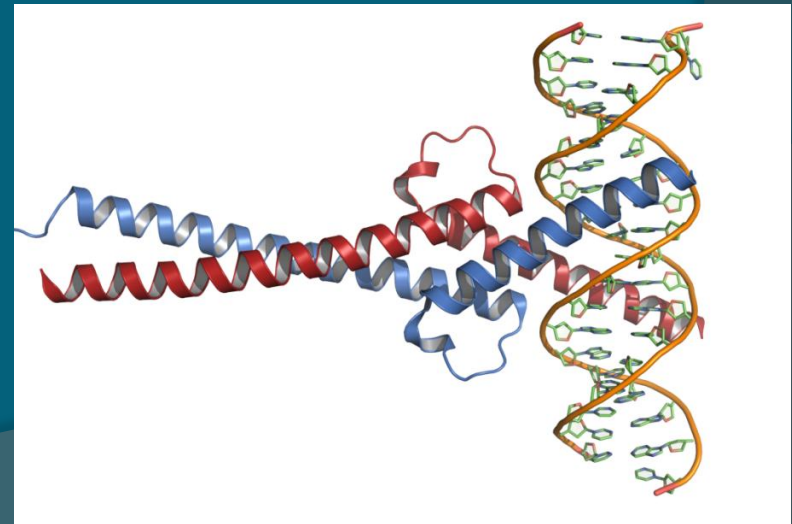
### Klf4 (Kruppel-like factor 4)

Klf4 è importante per l'auto-rinnovo delle cellule staminali pluripotenti e il mantenimento della pluripotenza assieme agli altri fattori importanti di trascrizione Oct4 Sox2 e c-Myc.



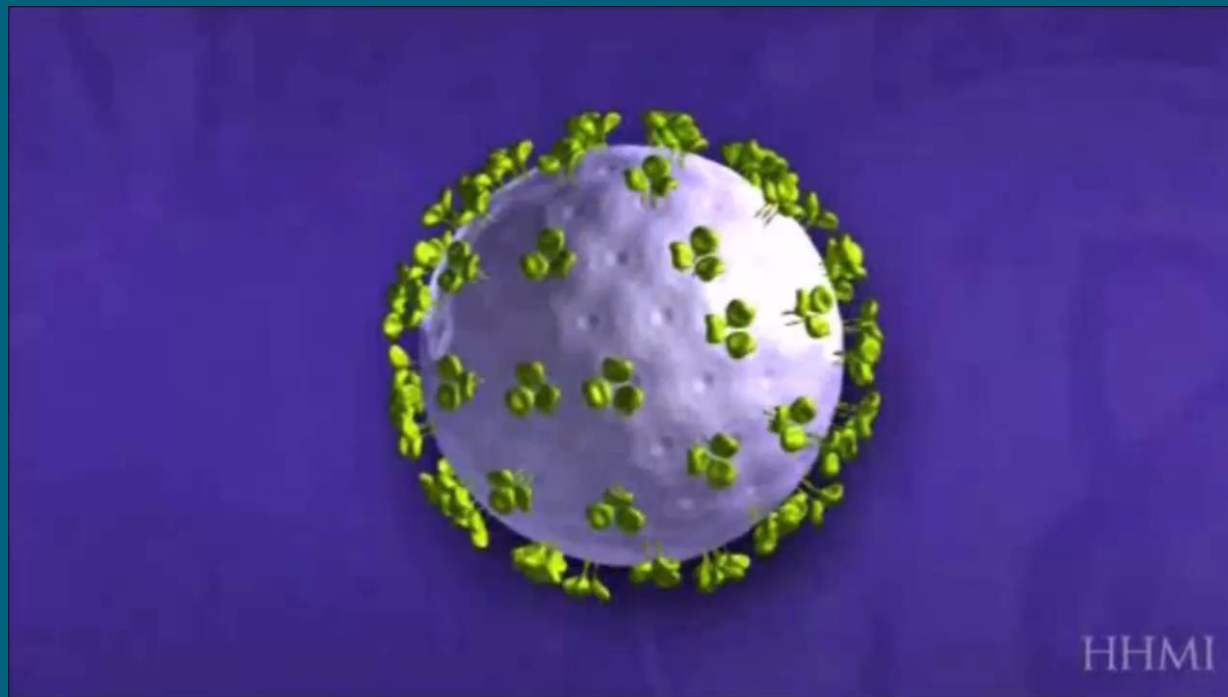
### C-Myc

c-Myc deriva dalla Myc family che è coinvolta nei processi cellulari come crescita, metabolismo, apoptosi.



# Retrovirus come driver

I retrovirus vengono usati per distribuire i 4 geni (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) all'interno delle cellule somatiche. L'efficienza della trasduzione con retrovirus è alta e questo rende i retrovirus interessanti.





# Retrovirus come driver

I retrovirus vengono usati per distribuire i 4 geni (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) all'interno delle cellule somatiche. L'efficienza della trasduzione con retrovirus è alta e questo rende i retrovirus interessanti.



Svantaggi

# Retrovirus come driver

I retrovirus vengono usati per distribuire i 4 geni (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) all'interno delle cellule somatiche. L'efficienza della trasduzione con retrovirus è alta e questo rende i retrovirus interessanti.



## Svantaggi



Il DNA retrovirale integrato nel genoma della cellula ospite segue un'integrazione randomica. Retrovirus possono introdurre elementi promotori, e possono intersorsi in sequenze codificanti interferendo con la trascrizione.

# Retrovirus come driver

I retrovirus vengono usati per distribuire i 4 geni (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) all'interno delle cellule somatiche. L'efficienza della trasduzione con retrovirus è alta e questo rende i retrovirus interessanti.



## Svantaggi



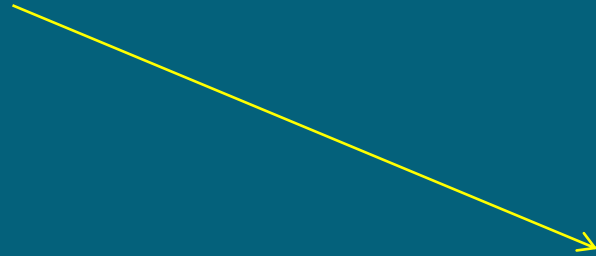
I livelli di trascrizione dei quattro geni nel costrutto retrovirale diminuiscono con il passaggio della cellula nello stato pluripotente comportando un calo nella produzione di linee di iPSC stabili.

# Retrovirus come driver

I retrovirus vengono usati per distribuire i 4 geni (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) all'interno delle cellule somatiche. L'efficienza della trasduzione con retrovirus è alta e questo rende i retrovirus interessanti.



## Svantaggi



Esiste la possibilità, che questi vettori virali si riattivino spontaneamente e diventino patogeni.

# Cancerogenicità

Un altro serio problema è legato al fatto che i 4 geni possono indurre a fattori di neoplasia

Un'alta concentrazione di Oct4 causa nei topi la displasia delle cellule epiteliali

Un'anormale espressione del gene Sox2 causa carcinomi del colon

Un'elevata espressione di Klf4 causa tumore al petto

Il gene c-Myc causa il più alto tasso di tumori tra cui quelli al collo

# Soluzioni ai problemi

- ⦿ Scelta di un set di geni meno cancerogeno e disponibile alla riprogrammazione;
- ⦿ La minimizzazione del numero richiesto di geni per la riprogrammazione;
- ⦿ La ricerca di sistemi per l'eliminazione di DNA esogeno dal genoma della cellula ospite dopo la riprogrammazione;
- ⦿ La ricerca di modi per riprogrammare cellule somatiche usando proteine ricombinanti

# Soluzioni ai problemi

L'espressione ectopica di c-Myc e Klf4 è la più pericolosa. Questi geni possono essere sostituiti da NANOG e LIN28 per la riprogrammazione di cellule umane.

Le iPSCs possono essere ottenute da fibroblasti utilizzando i fattori di Oct4, Sox2, e Klf4, ma senza c-Myc. Tuttavia, in questo caso, la riprogrammazione è decelerata e si osserva un difetto essenziale di cloni stabili di iPSC.

La riduzione di un certo numero di fattori necessari senza diminuzione di efficienza è possibile quando si producono iPSCs da cellule staminali neurali (NSC)

iPSCs sono state prodotte da NSCs isolate dal cervello di topi adulti utilizzando due fattori, Oct4 e Klf4, come pure Oct4 da solo. L'irrilevanza degli altri geni in questo processo deriva da un alto livello di geni endogeni nelle NSCs

# Soluzioni ai problemi

Altre cellule che non necessitano di tutti i 4 geni per la riprogrammazione sono quelle adipose (ASCs).

L'utilizzo di composti chimici che operano a livello epigenetico aumentano l'efficienza della riprogrammazione e permettono di utilizzare solo Oct4 e Klf4. In particolare il **BIX-01294** unito al **BayK864** aumentano di 15 volte la produzione di iPCSs e **BIX-01294** unito ad **RG108** di 30 volte.

**L'acido valproico (VPA)** può sostituire il gene c-Myc ed aumentare il tasso di riproduzione di 50 volte. Altri sostituti al gene c-Myc possono essere:

- **TSA** (trichostatin A)
- **SAHA** (suberoylanilide hydroxamic acid)



# Human iPSC

Cell

## Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,<sup>1</sup> Koji Tanabe,<sup>1</sup> Mari Ohnuki,<sup>1</sup> Megumi Narita,<sup>1,2</sup> Tomoko Ichisaka,<sup>1,2</sup> Kiichiro Tomoda,<sup>3</sup> and Shinya Yamanaka<sup>1,2,3,4,\*</sup>

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

<sup>2</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

<sup>3</sup>Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA

<sup>4</sup>Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

\*Correspondence: [yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp](mailto:yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp)

DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019

### SUMMARY

Successful reprogramming of differentiated human somatic cells into a pluripotent state would allow creation of patient- and disease-specific stem cells. We previously reported generation of induced pluripotent stem (iPS) cells, capable

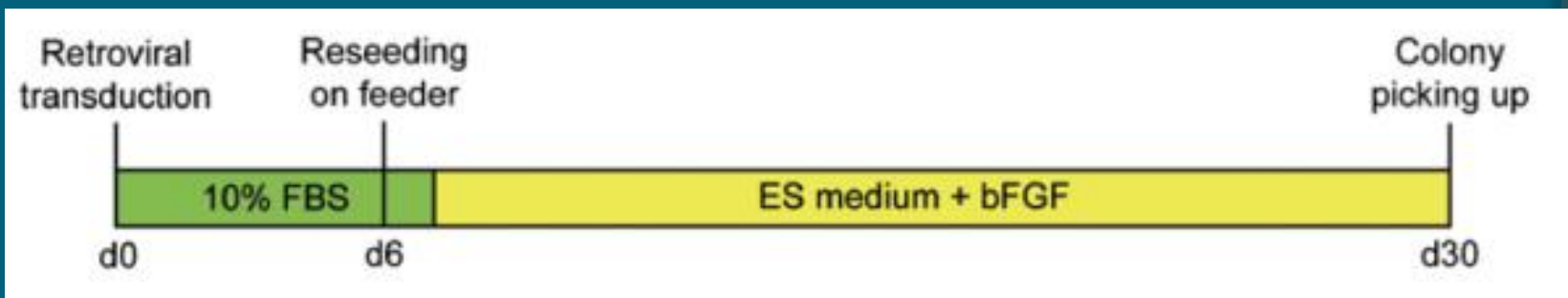
of inducing pluripotent status in somatic cells by direct reprogramming (Yamanaka, 2007).

We showed that induced pluripotent stem (iPS) cells can be generated from mouse embryonic fibroblasts (MEF) and adult mouse tail-tip fibroblasts by the retrovirus-mediated transfection of four transcription factors, namely Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Mouse iPS cells are indistinguishable from

# hiPSC

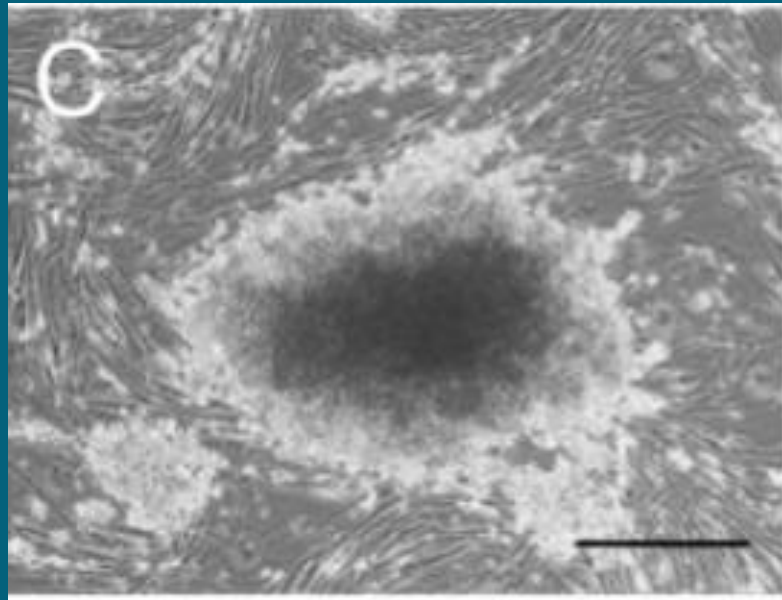
Il retrovirus contenente i 4 fattori viene introdotto nei fibroblasti del derma umano (HDFs)

- dopo 6 giorni le cellule sono state raccolte e trasferite in un mezzo contenente il 10% di FBS (siero fetale bovino).
- Al 7 giorno il mezzo di coltura è stato sostituito con un altro mezzo contenente bFGF( fattore di crescita per fibroblasti)



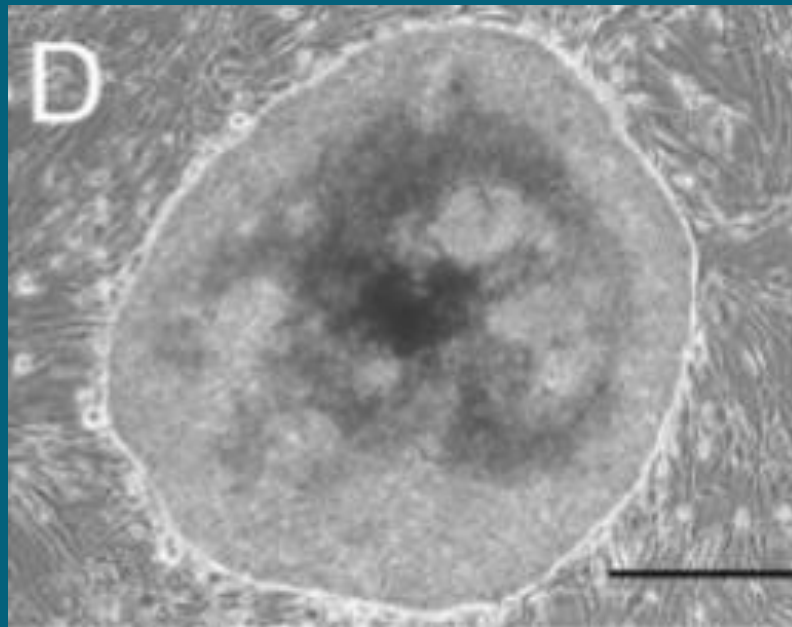
# hiPSC

Dopo due settimane appaiono colonie non simili in morfologia alle hES



# hiPSC

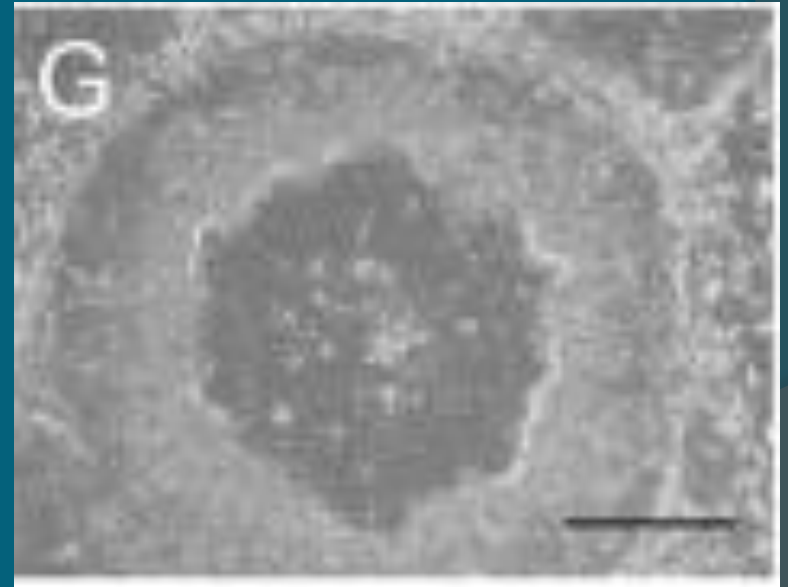
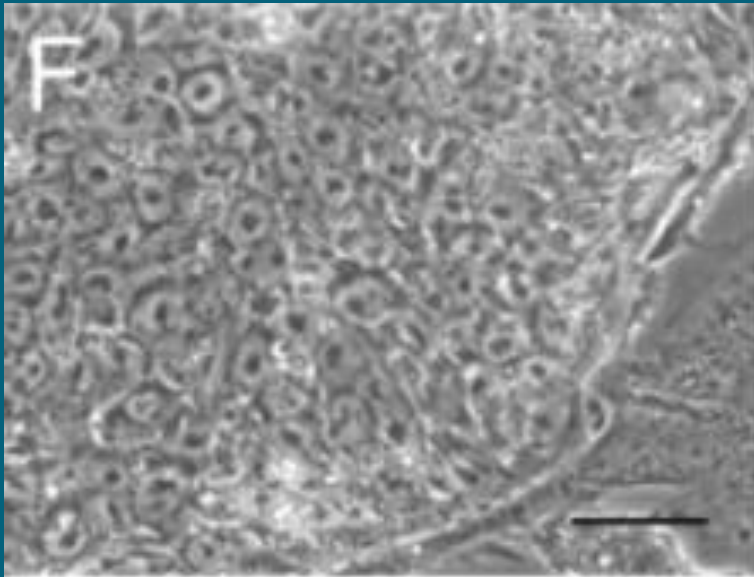
Dopo 25 giorni si osservano tipi di colonie piatte e piuttosto somiglianti alle hES



# hiPSC

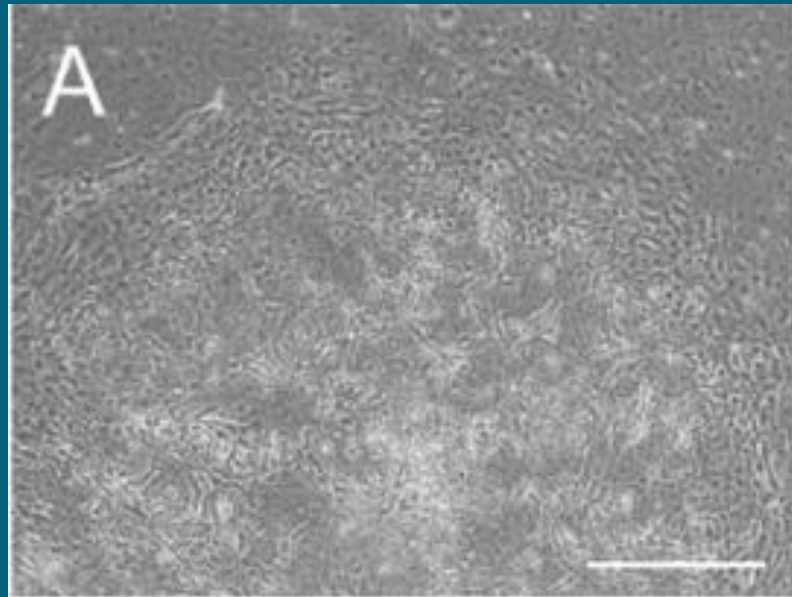
Il 30 giorno le hES sono state disaggregate meccanicamente in piccoli aggregati attraverso la digestione enzimatica.

Ingrandendo molto l'immagine si nota come queste mostrino morfologia similare alle ES umane ovvero con nucleoli larghi ed esiguo citoplasma



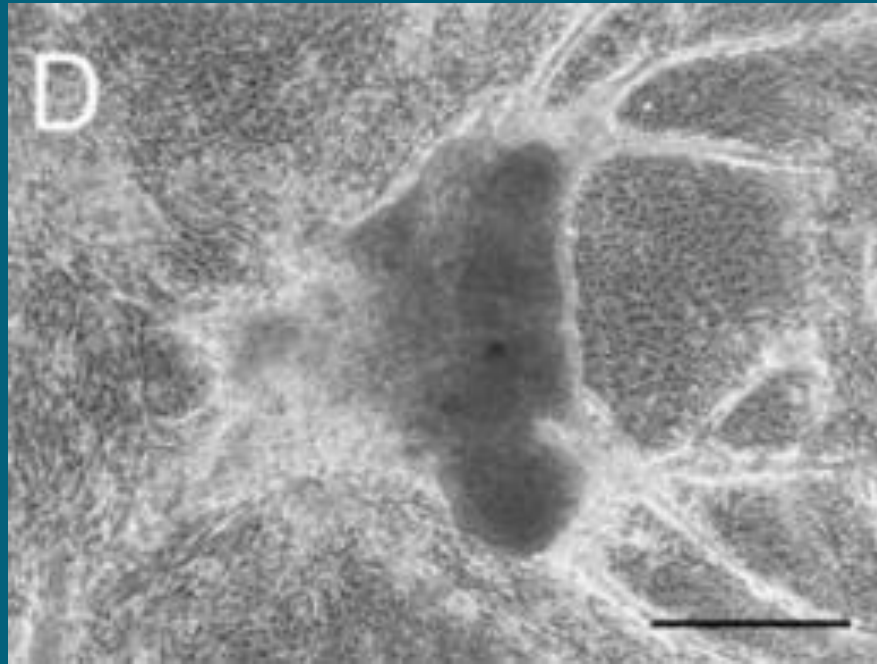
# Differenziazione

Abbiamo piantato le iPS in un PA6 feederlayer ovvero un terreno per colture stromali, le cellule si sono diffuse drasticamente, e abbiamo notato alcune strutture di tipo neuronale.



# Differenziazione

Dopo circa 12 giorni di induzione alla differenziazione alcuni “grappoli” di cellule hanno iniziato a contrarsi. L’analisi dei dati ha mostrato come queste esprimessero marcatori cariomiocitici



# *E' possibile generare un topo da cellule iPS. Lo dimostrano 3 diversi studi*

## **iPS Cells Can Support Full-Term Development of Tetraploid Blastocyst-Complemented Embryos**

Lan Kang,<sup>1,2</sup> Jianle Wang,<sup>2</sup> Yu Zhang,<sup>2</sup> Zhaohui Kou,<sup>2</sup> and Shaorong Gao<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

<sup>2</sup>National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China

\*Correspondence: [gaoshaorong@nibs.ac.cn](mailto:gaoshaorong@nibs.ac.cn)

DOI 10.1016/j.stem.2009.07.001

---

## **iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation**

Xiao-yang Zhao<sup>1,2\*</sup>, Wei Li<sup>1,2\*</sup>, Zhuo Lv<sup>1,2\*</sup>, Lei Liu<sup>1</sup>, Man Tong<sup>1,2</sup>, Tang Hai<sup>1</sup>, Jie Hao<sup>1,2</sup>, Chang-long Guo<sup>1,2</sup>, Qing-wen Ma<sup>3</sup>, Liu Wang<sup>1</sup>, Fanyi Zeng<sup>3,4</sup> & Qi Zhou<sup>1</sup>

---

## **Adult mice generated from induced pluripotent stem cells**

Michael J. Boland<sup>1\*</sup>, Jennifer L. Hazen<sup>1\*</sup>, Kristopher L. Nazor<sup>1\*</sup>, Alberto R. Rodriguez<sup>2</sup>, Wesley Gifford<sup>3</sup>, Greg Martin<sup>2</sup>, Sergey Kupriyanov<sup>2</sup> & Kristin K. Baldwin<sup>1</sup>

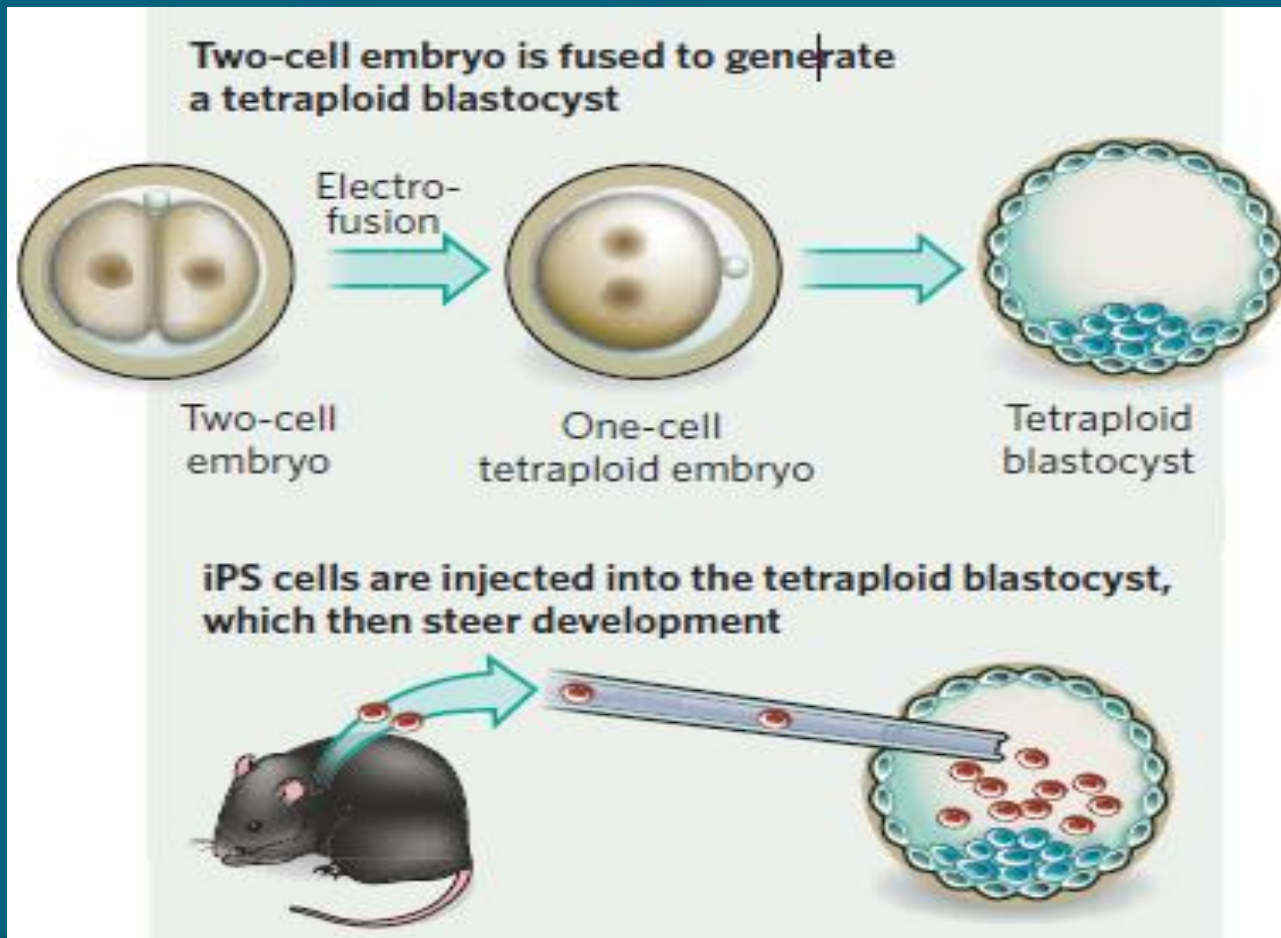


I ricercatori iniziarono con la creazione di cellule iPS usando il metodo di Yamanaka, ovvero utilizzando vettori virali per introdurre quattro geni nei fibroblasti di topo.

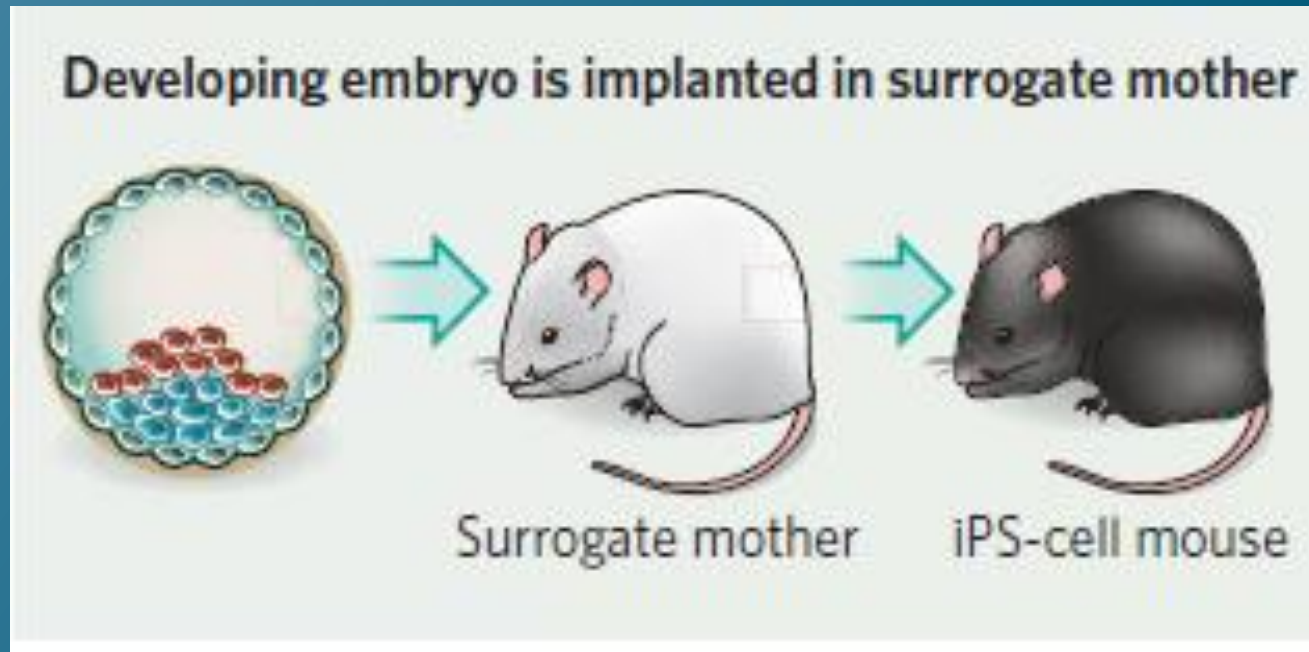
Non tutte le cellule trattate con i fattori di Yamanaka risultavano riprogrammate in modo corretto (ovvero non tutte erano in grado, una volta tornate allo stato embrionale, di differenziarsi in qualsiasi cellula del corpo).

Sono state selezionate (con appositi test) le cellule che mostravano sulla superficie le proteine specifiche (markers) delle cellule embrionali.

Per proseguire nel tentativo di generare un animale vivo, una volta selezionate le cellule, è stata utilizzata una tecnica complessa chiamata **COMPLEMENTAZIONE TETRAPLOIDE**.



La blastocisti tetraploide in cui sono state iniettate le iPS è stata impiantata in una femmina surrogata e, venti giorni più tardi è nato il topo, che si presentava nero come quello usato per creare le cellule iPS e diverso dal topo bianco usato per creare l'embrione tetraploide.

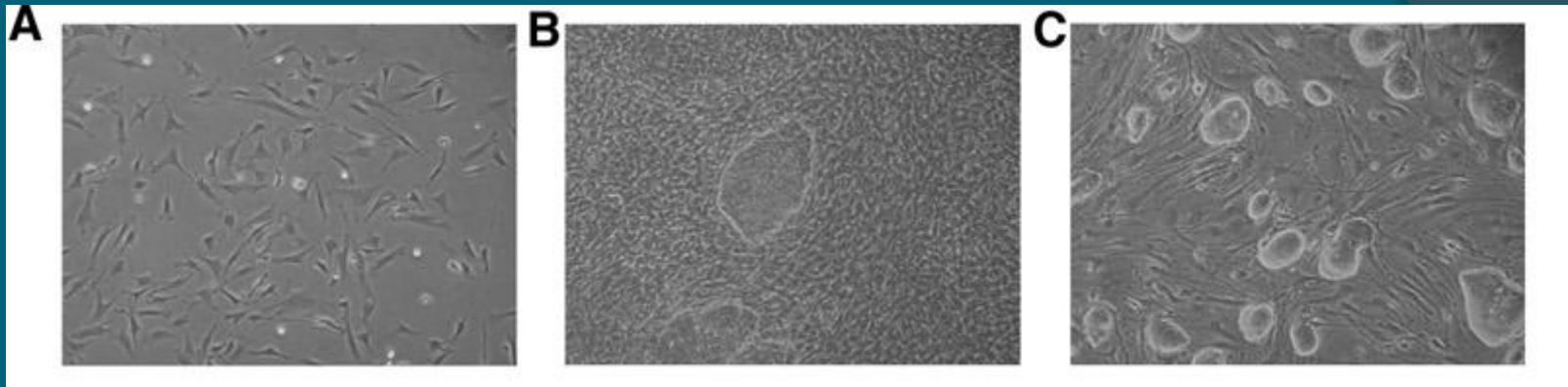


# PRIMO STUDIO

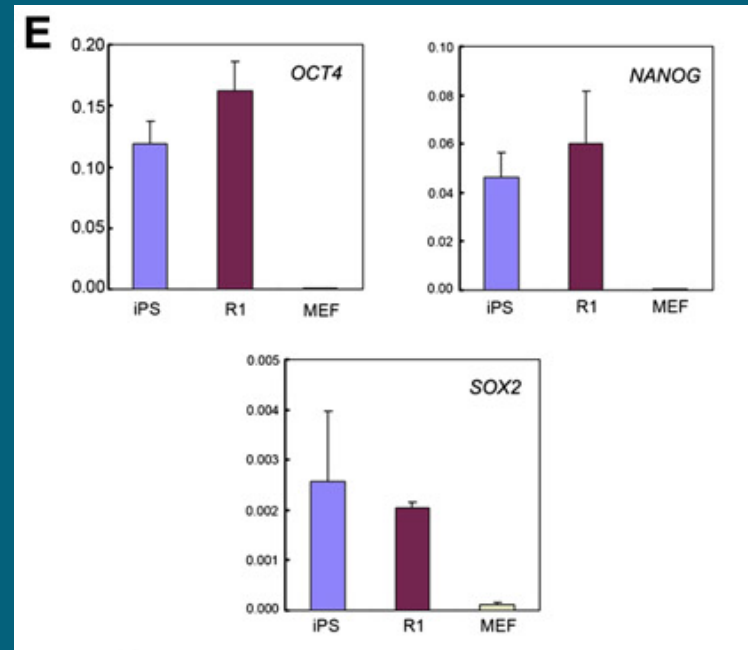
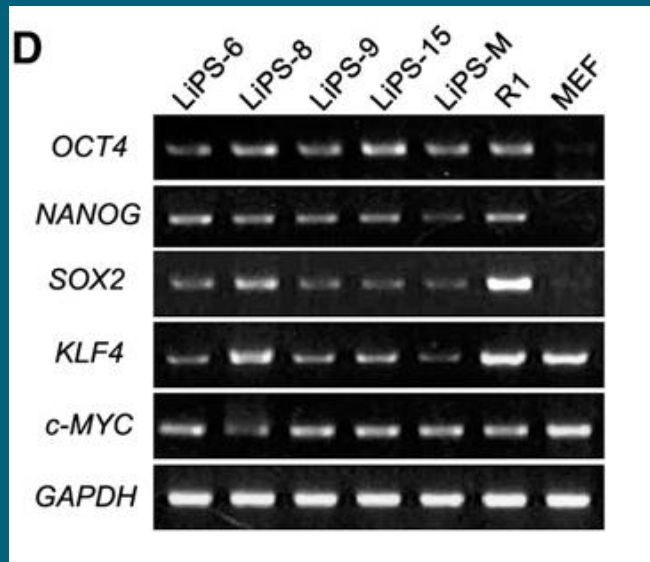
## Generation of iPS cell-tetraploid pups

Genotype of tetraploid embryos	No. embryos transferred	No. surrogate mothers	No. total newborns (%)	No. live pups (%)
B6D2F1×B6D2F1	200	7	2 (1)	0 (0)
ICR×ICR	187	7	2 (1.07)	1 (0.53)

Nel primo studio, pubblicato su STEM CELL da Sharong Gao et al., il tasso di successo è stato del 1,1 % (2 nati su 187 tentativi).



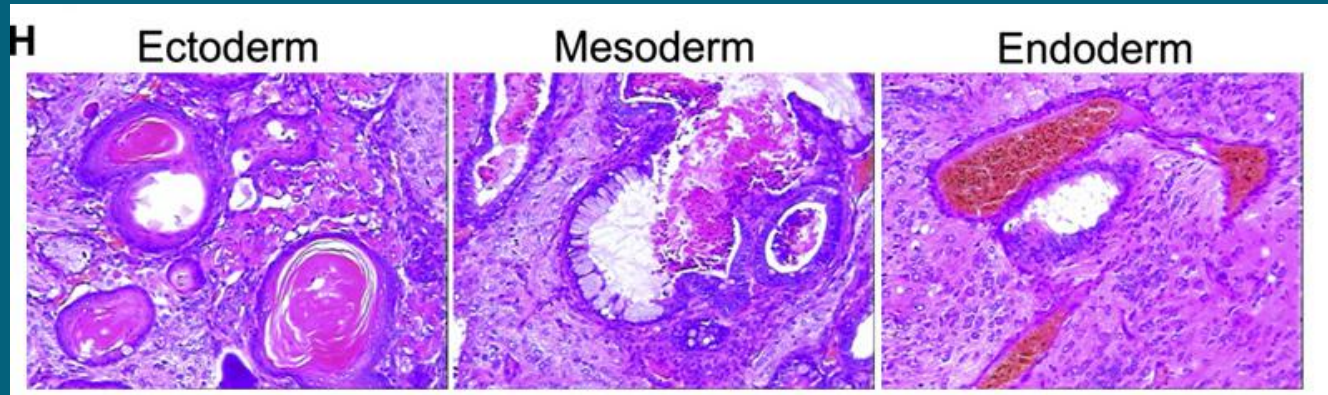
- (A) Morphology of MEF cells .  
 (B) Colonies formed after infection and Dox induction.  
 (C) Morphology of iPSCs.



(D) RT-PCR revealed that inducible iPSCs expressed ESC marker genes including OCT4, SOX2, and NANOG.

(E) qPCR revealed that the expression level of ESC marker genes in iPSCs was similar to that of normal ESCs, but showed dramatic differences related to MEFs.

- Immunofluorescent staining.
- Southern blot analysis.
- (H) Teratomas formed 4 weeks after injection of iPSCs into SCID mice.



One pup survived into adulthood and appears to be healthy



# SECONDO STUDIO

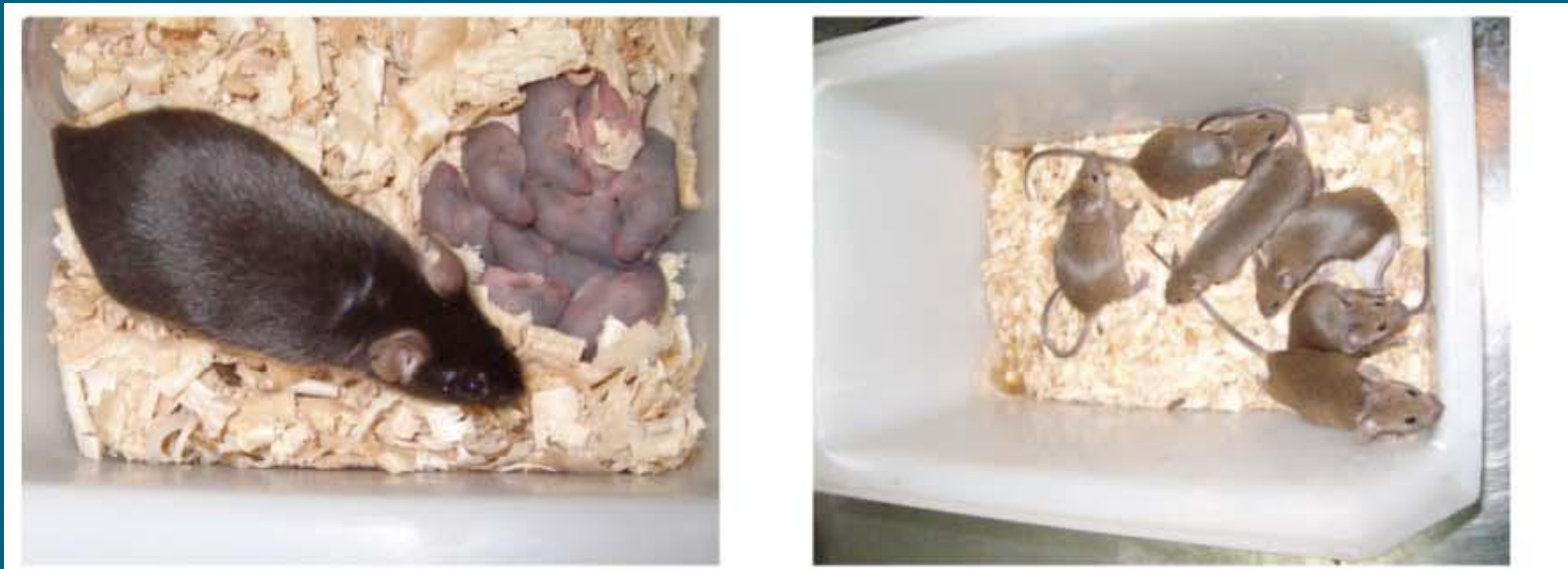
**Table 1 | Developmental efficiency of embryos produced**

Cell line	2N injection				4N injection (%)			
	Injected blastocysts	Live chimaeras	Chimaerism (%)	Germ line	Injected blastocysts	Embryos arrested at E10.5–E13.5	Embryos arrested at E15.5–E17.5	Live pups
IP14D-1	135	6	20–95	Yes	624	7 (1.1)	4 (0.6)	22 (3.5)
IP14D-6	97	10	20–90	Yes	12	–	–	2 (2.2)
IP14D-101	360	18	10–90	Yes	181	15 (8.3)	–	4 (2.2)
IP20D-3	236	14	20–80	Yes	204	6 (2.9)	2 (1.0)	0
IP20D-19	48	4	10–70	Yes	273	24 (8.8)	–	0
IP36D-3	233	6	5–70	Not yet	229	4 (1.7)	0	0
Control (ES1)	NT	–	–	–	100	–	–	3 (3.0)
Control (CL11)	NT	–	–	–	51	5 (9.8)	–	1 (2.0)

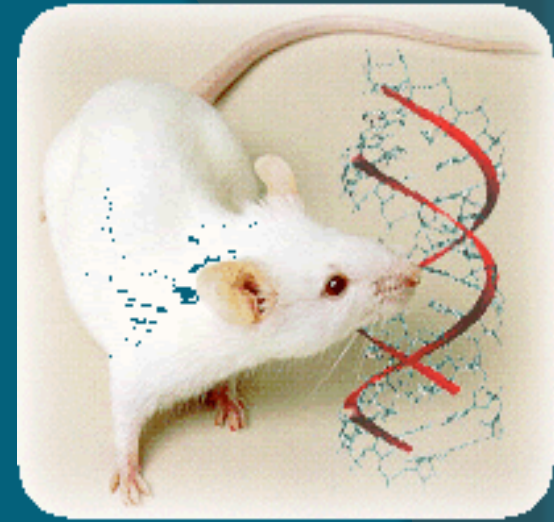
Embryos were produced by blastocyst injection (2N) and tetraploid complementation (4N). IP14D-101 has a genetic background of C57 × 129S2, whereas the rest are from C57 × DBA F<sub>1</sub> (B6D2F1). NT, not tested.

- Generazione iPS cells da MEFs cells tramite infezione retrovirale.
- Ottenimento di 37 linee cellulari e test di pluripotenza attraverso la colorazione con fosfatasi alcalina e analisi di immunofluorescenza.
- Test del teratoma eseguiti iniettando cellule iPS nel fianco sottocutaneo di topi affetti da SCID seguiti da esami istologici del tumore.
- Sequenza del genoma, analisi cariotipica, Southern blot e PCR inverso.
- Complementation dell'embrione tetraploide è stata portata avanti iniettando le cellule iPS (mantello nero) nell'embrione tetraploide (mantello bianco). Gli embrioni derivati dall'iniezione delle blastocisti tetraploidi (4N) sono stati sezionati in diverse fasi della gestazione e alla nascita e analizzati per valutarne la morfologia e la capacità di sviluppo.
- Infine sono state messe a confronto l'espressione genica delle cellule ES e delle iPS.

The black mouse represents one of the live iPS 4N-comp mice at 15 weeks. Note the uniform black coat of this 'all-iPS mouse', resembling the coat colour of the original line of the Oct4–GFP MEF cells from which it was derived. All the progeny presented with a uniform brown coat colour typical of matings between a black (that is, iPS 4N-comp) and a white mouse







Zeng e Zhou hanno sottolineato quanto sia importante il tempo: le cellule che hanno formato linee cellulari iPS velocemente (dopo 14 giorni) hanno avuto successo, mentre quelle che hanno formato colonie dopo 20 o 36 giorni non hanno funzionato.

Entrambi i gruppi stanno cercando di capire quali differenze tra ES cells e iPS cells possano spiegare le malformazioni, l'alto tasso di morte, e il fatto che molte linee cellulari iPS non sembrano funzionare nella produzione di topi.

## TERZO STUDIO

Il maggior successo dell'ultimo lavoro sembra dipendere da:

- trattamento delle cellule con

### ACIDO VALPROICO (VPA)

```
graph TD; VPA[ACIDO VALPROICO (VPA)] --> A[Migliora l'efficienza di riprogrammazione]; VPA --> B[Inibisce la proliferazione delle cellule non completamente "trasformate"];
```

Migliora l'efficienza di  
riprogrammazione

Inibisce la proliferazione delle  
cellule non completamente  
“trasformate”

- Un meccanismo che impedisce l'espressione dei 4 geni durante la gestazione

**Table 1 | Summary of blastocyst injections**

Cell line	Chimaera (2n)	Blastocysts injected (4n)	Day fetuses removed	Live fetuses (% inj.)	Live pups (% inj.)	Suckling pups (% inj.)
iMZ-9	Y	172	E16.5	11 (6%)	—	—
iMZ-9	Y	25	E17.5	2 (8%)	—	—
iMZ-9	Y	195	E18.5	—	7 (3.6%)	4 (2%)
iMZ-21	Y	140	E18.5	—	18 (13%)	10 (7%)
iMZ-15	n.d.	257	E18.5	—	—	0
iMZ-11	Y	338	E18.5	—	1 (0.3%)	0
iNZ-3	n.d.	120	E18.5	—	0	0
iNZ-19	Y	131	E18.5	—	0	0

Y denotes iPS cell lines that contributed to diploid chimaeras; n.d. denotes lines that were not tested. Recipients were either euthanized at E16.5 or E17.5 or delivered by Caesarean at E18.5. The numbers of live fetuses, live pups and suckling pups surviving after postnatal day 1 are shown with the percentage of total blastocysts (% injection (inj.)).

Nell'ultimissimo lavoro pubblicato su Nature da Kristin Baldwin in California la percentuale di successo (numero di nati sani su numero di blastocisti impiantate) è stata del 13%, paragonata a quella ottenuta utilizzando cellule totipotenti embrionali.

I topi non sopravvissuti sono morti per difficoltà respiratorie tipiche di animali nati con la tecnica della complementazione tetraploide usando ES.

Dato che una riprogrammazione non corretta potrebbe inibire lo sviluppo embrionale e postnatale → utilizzata una riprogrammazione lentivirale farmacoindotta (trattamento con dox+VPA) per raggiungere uno stretto controllo dell'espressione genica.

Di tutte le linee ottenute sono state scelte le più somiglianti per morfologia, tasso di proliferazione e espressione dei marcatori di pluripotenza alle ES.

iPS Mouse: 4wk



Per dimostrare che i topi provenissero interamente dalle iPSC sono stati analizzati pelo e colore degli occhi attraverso colorazioni istologiche. Il colore dei topi iPSC differisce sia dal topo albino da cui sono state ricavate le blastocisti tetraploidi sia dalla madre surrogata.

Analisi genetiche hanno escluso la contaminazione delle linee cellulari iPSC da parte delle cellule embrionali utilizzate per la realizzazione della blastocisti tetraploide.

La riprogrammazione delle cellule iPS dovrebbe essere ulteriormente approfondita per meglio identificare i fattori critici al fine di incrementare le capacità di sviluppo delle linee cellulari iPS .

**Questi risultati hanno però fornito la prima prova evidente che le cellule iPS sono realmente pluripotenti , caratteristica fondamentale utilizzabile per importanti applicazioni terapeutiche.**

*“La riprogrammazione cellulare è molto promettente ma non può sostituire lo studio sulle cellule embrionali. I due campi di ricerca non sono alternativi e non si escludono a vicenda. “*

*(cit. Zhou)*

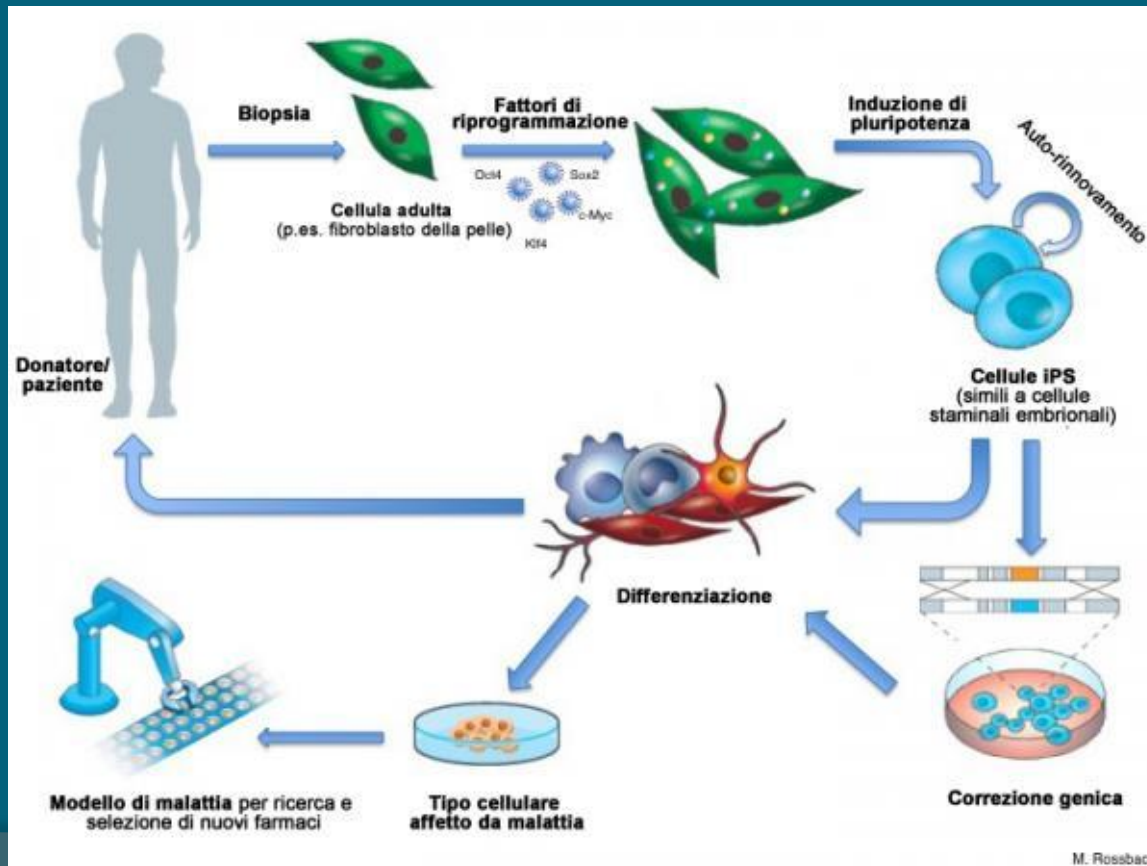
# Applicazioni iPSC

- MODELLIZZAZIONE MALATTIE per screening di farmaci e capire i meccanismi coinvolti nelle malattie
- TRAPIANTO DI CELLULE O TESSUTI creati dalle stesse iPSC

# MODELLIZZAZIONE MALATTIE

Attraverso la modellizzazione delle malattie è stato possibile

- definire la PATOGENESI di una malattia
- scoprire nuovi BIOMARCATORI coinvolti nella malattia



# MODELLIZZAZIONE MALATTIE

## Vantaggi cellule iPS vs ES

- ⦿ si ha una fonte ILLIMITATA di cellule colpite dalla malattia per effettuare lo studio
- ⦿ le cellule possono essere ricavate facilmente prendendo qualsiasi cellula del paziente



# MODELLIZZAZIONE MALATTIE

## IPSC NELLE MALATTIE DEL CERVELLO MODELLO DI PARKINSON

Attualmente il trattamento per il morbo di Parkinson mira solo ad alleviare i sintomi della malattia

Usando **Modelli Parkinson Disease (PD)** basati su **iPSC** si può fornire un quadro più dettagliato sui meccanismi di progressione della malattia e scoprire nuove terapie

Il morbo di Parkinson (PD) è la seconda malattia più diffusa nel mondo dopo l'Alzheimer e colpisce 2% della popolazione over 60.

Tasso di mortalità : 2 a 1 nei soggetti affetti

PD  
manifestazioni

<b>MOTORI</b>	tremore	Rigidità degli arti	Bradicinesia e instabilità posturale
<b>NON MOTORI</b>	Declino cognitivo	depressione	Disturbi del sonno

PD CARATTERISTICHE  
CLINICHE

Perdita dei neuroni dopaminergici DA della sostanza nera. (60% all'esordio dei sintomi)	Eccessivo accumulo di una proteina $\alpha$ -sinucleina che diffonde la malattia in tutto il cervello	infiltrazioni linfociti
---	---	-------------------------

# MODELLI PD

## I modelli PD di topo/animali:

Vantaggi: riproducono correttamente i neuroni DA

Svantaggi:

- non riescono a replicare la degenerazione in modo lento e progressivo
- non riescono a replicare la formazione dei corpi di Lewy

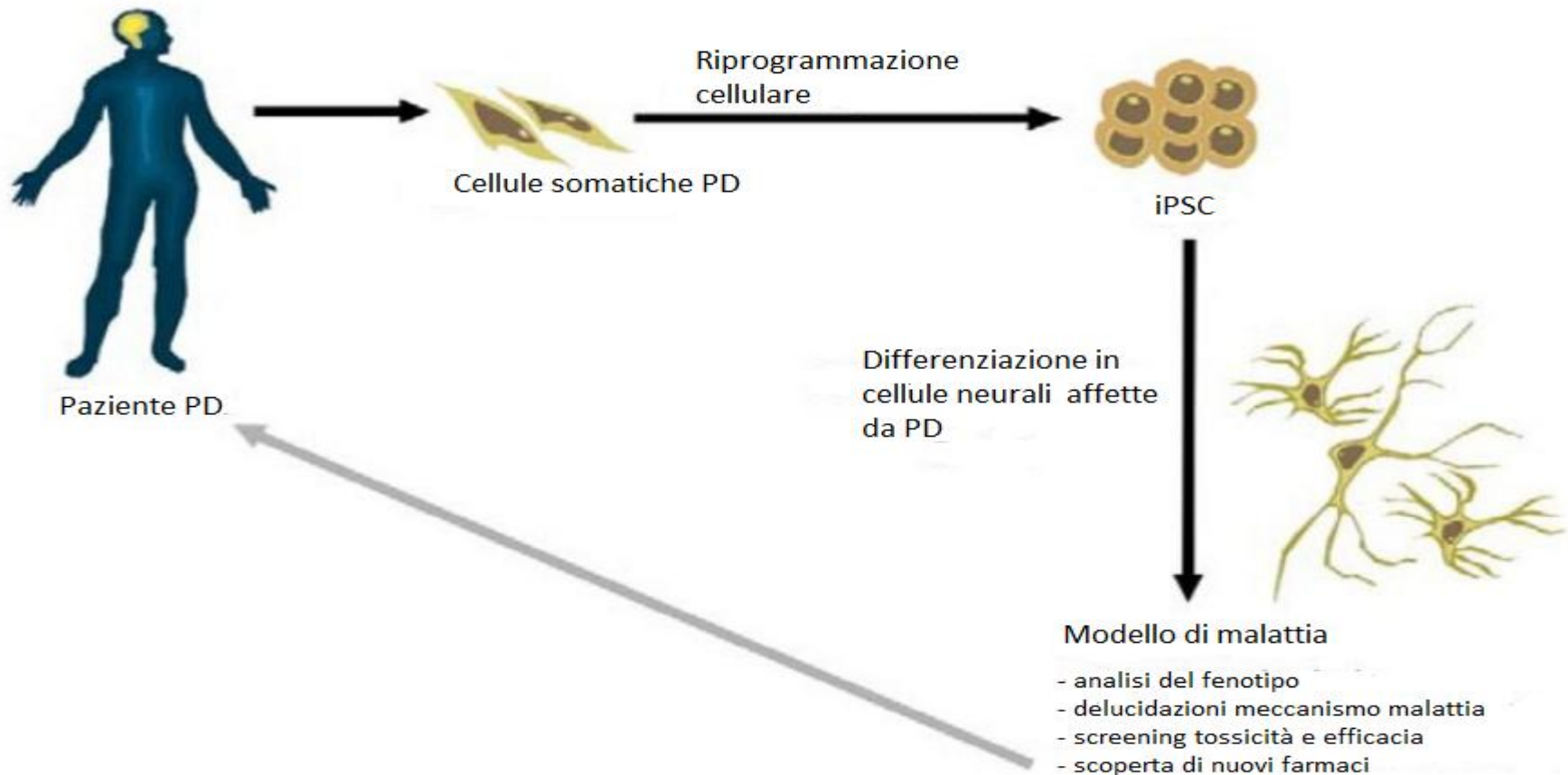
## I modelli PD cellulari:

Vantaggi: forniscono spunti utili che riguardano le alterazioni di lisosomi e mitocondri

Svantaggi: gli studi coinvolgono solo campioni umani post-mortem

La recente scoperta di **iPSC** offre la possibilità di riprodurre a livello molecolare cellulare i meccanismi sviluppati nella progressione della malattia.

## Riprogrammazione e uso di IPSC nel modello PD



Recentemente , molti laboratori di ricerca hanno riepilogato in vitro alcune caratteristiche del PD usando modelli basati su iPSC aprendo la strada a nuove interazioni biomolecolari che si verificano.

# MODELLI PD-IPSC NELLO STUDIO MUTAZIONI GENETICHE

- 1. Mutazione A53T-SNA:** Il modello ha mostrato il legame tra lo stress nitrosativo e quello del reticolo ER e accumulo di  $\alpha$ -syn
- 2. Mutazione del gene GBA1:** porta all'accumulo di  $\alpha$ -syn e cambiamenti nel sistema lisosomiale e nell'omeostasi di calcio, una minaccia per DA-PD
- 3. Mutazioni genetiche associate a PINK1 E PARK2:** associata a stress mitocondriale .DA derivate da iPSC hanno confermato che la proteina Parkin viene traslocata nei mitocondri innescando autodegradazione
- 4. MUTAZIONE G2019S ASSOCIATA A LRRK2:** provoca iperattività dell'enzima LRRK2. I modelli PD-IPSC hanno riepilogato caratteristiche come accumulo di  $\alpha$ -syn e incremento di geni responsabili di stress ossidativo.

# Cosa si può fare ?

- Modelli di iPSC per individuazione di potenziali farmaci
- Tecnologia iPSC nell'identificazione di biomarcatori PD per una diagnosi precoce e trattamenti in fase preclinica
- Protocolli ottimali di differenziazione uniti a software di analisi per stimare caratteristiche di interesse



# TERAPIA SOSTITUZIONE CELLULE O TESSUTI

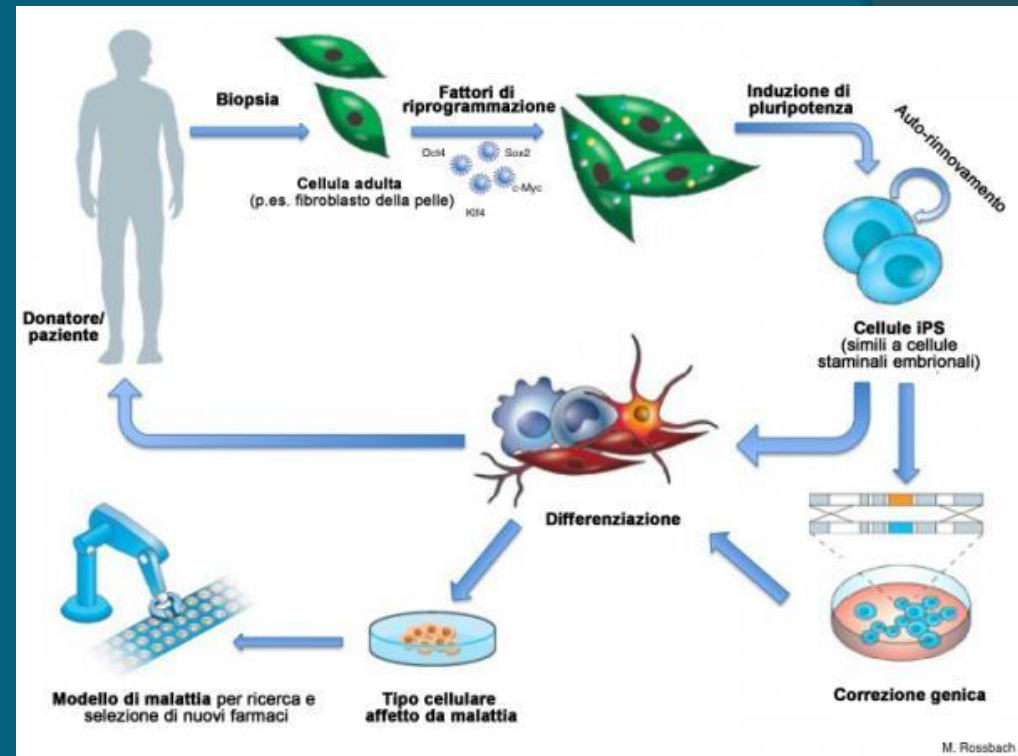
Vantaggi cellule iPS vs ES :

- uso di iPSC derivanti dallo stesso paziente previene il rigetto da parte dell'organismo
- ELIMINAZIONE DELL'UTILIZZO DI IMMUNOSOPPRESSIVI

# TERAPIA SOSTITUZIONE CELLULE O TESSUTI

Si avvale dell'ingegneria genetica che permette:

- modifica e correzione difetti nei geni
- cellule corrette rimpiazzano il tessuto danneggiato
- possibilità di curare malattie genetiche e degenerative



# TERAPIA SOSTITUZIONE CELLULE O TESSUTI

## STUDI EFFETTUATI

In uno studio su topi per le lesioni del midollo spinale, sono state generate iPSCs. Con la presenza di acido retinoico sono stati creati corpi embrionali che poi sono stati indotti a differenziarsi formando neurosfere.

Prima dell'iniezione nei topi, le neurosfere sono state testate per la loro sicurezza con un trapianto in topi affetti da immunodeficienza combinata grave (SCID) e non è stato osservato lo sviluppo di alcun tumore. Le neurosfere sono state poi iniettate in topi con lesioni del midollo spinale. Le neurosfere differenziate nelle linee neurali hanno permesso la riparazione delle fibre serotoninergiche e conseguentemente il recupero movimento.

# TERAPIA SOSTITUZIONE CELLULE O TESSUTI

## STUDI EFFETTUATI

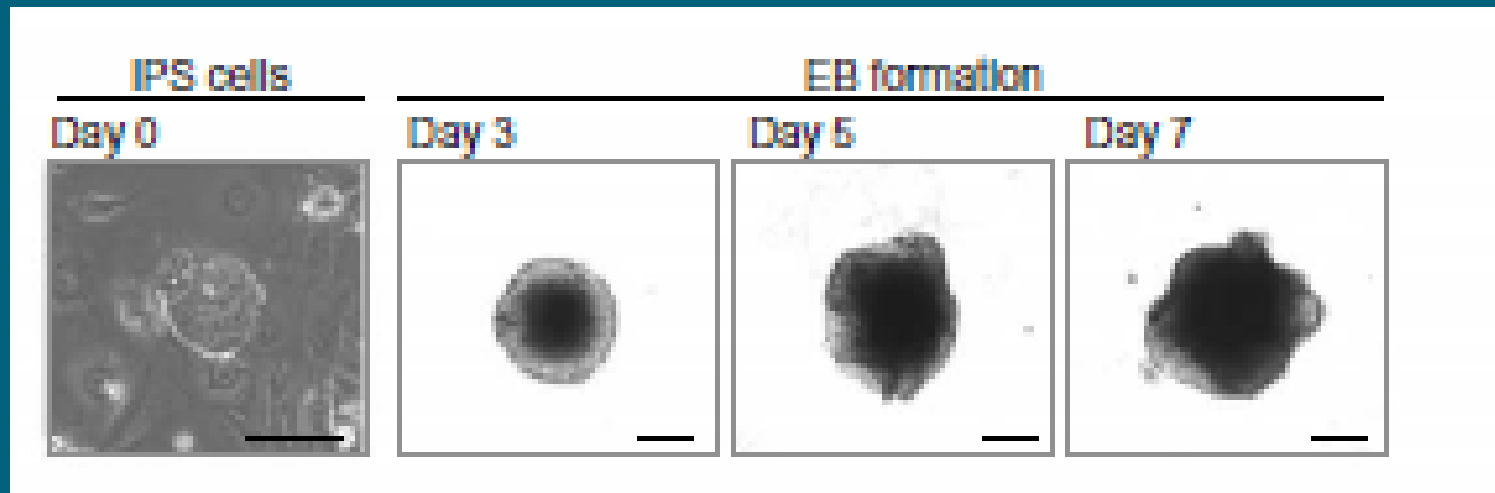
**Creazione in laboratorio di una pelle dotata di**

- ⦿ annessi cutanei
- ⦿ ghiandole sudoripare
- ⦿ integrabile con i tessuti circostanti



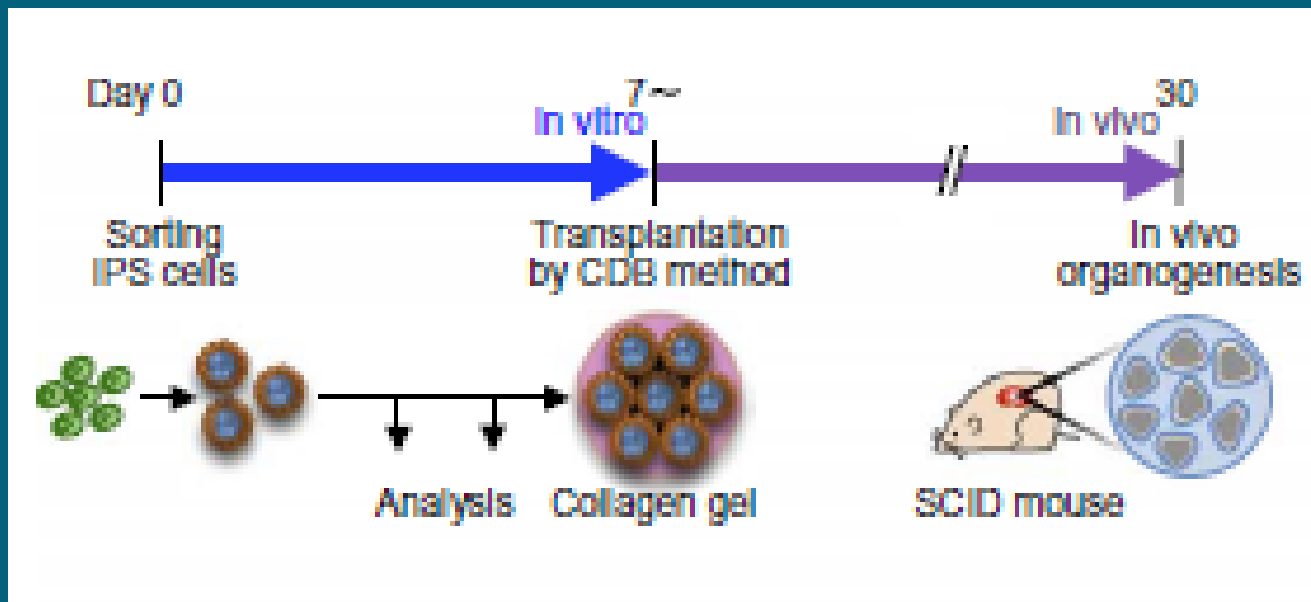
# Metodi

- prelievo di cellule adulte dal tessuto gengivale
- le cellule sono state fatte regredire a cellule staminali pluripotenti indotte
- IPSc sono state poi messe in coltura con un mediatore biologico noto come Wnt10b
- si ottiene quello che è chiamato corpo embrioido (EB), un ciuffo tridimensionale di cellule.



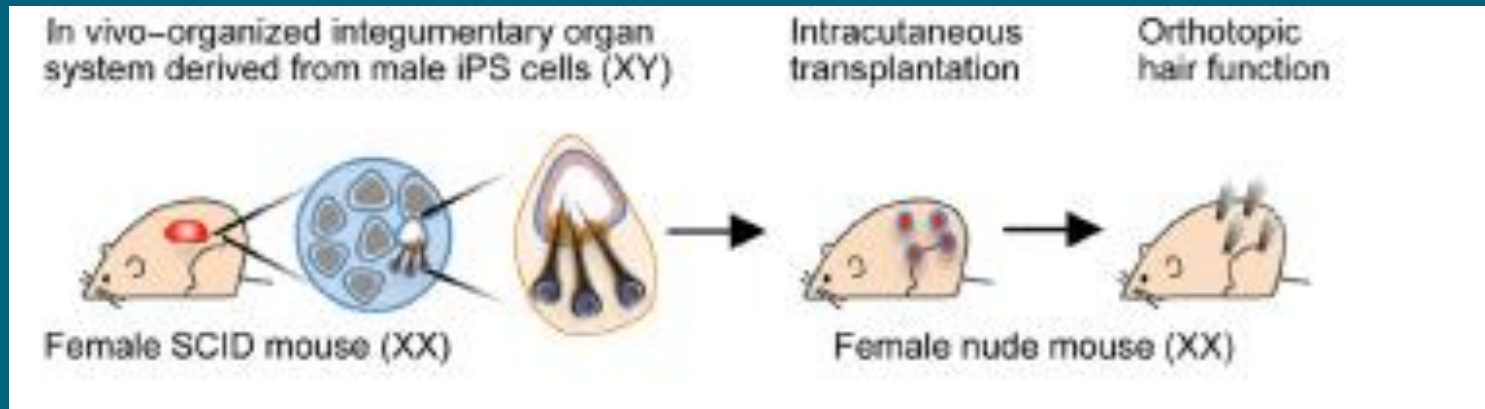
# Metodi

- i corpi embrioidi sono trapiantati in un ceppo di topi fortemente immunodeficienti
- le cellule iniziano a differenziarsi nel corretto modo naturale.



# Metodi

- Una volta differenziate, queste cellule sono state nuovamente prelevate e trapiantate nel topo ricevente finale.



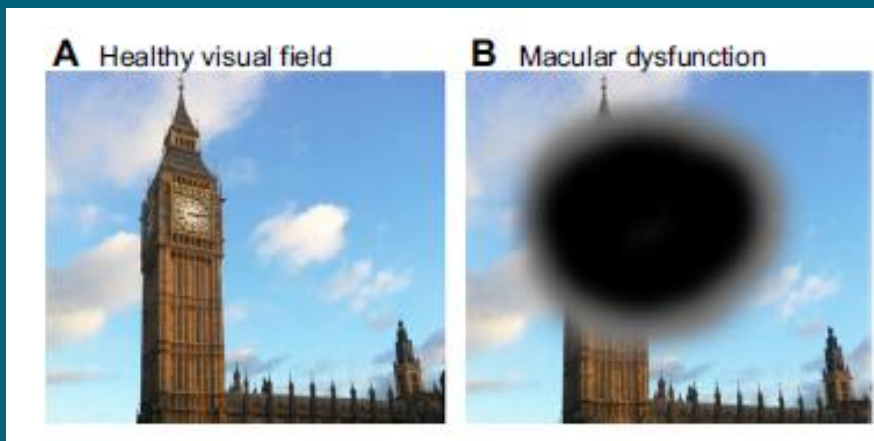
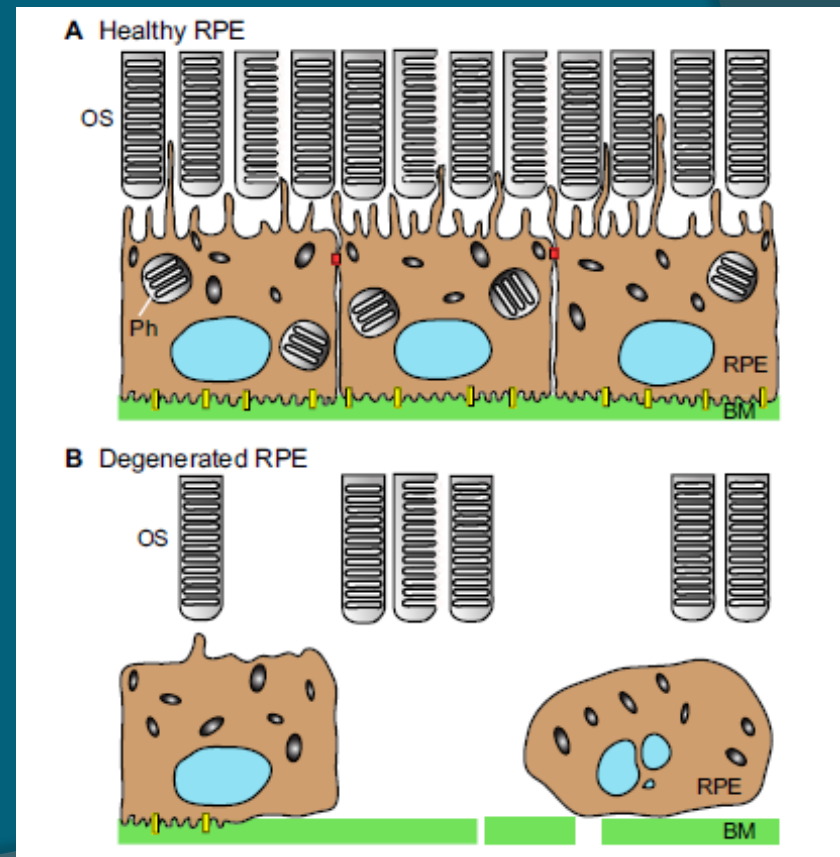
# APPLICAZIONI IN AMBITO CLINICO

Primo trapianto di hPSc per trattare la degenerazione maculare senile

La **Degenerazione Maculare Senile** è una malattia legata all'invecchiamento che colpisce la **Macula**, ossia la porzione più centrale della retina.

La degenerazione del pigmento della retina avviene a causa di un'anormale crescita dei vasi sanguigni.

È la principale causa di perdita grave della visione centrale dopo i 55 anni.





# APPLICAZIONI IN AMBITO CLINICO

## Metodi

- Fu selezionata una paziente che soffriva di degenerazione maculare senile
- Sono state prese dal paziente le cellule della pelle che sono state isolate e riprogrammate
- Le cellule riprogrammate ips sono state differenziate in cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE)
- le cellule del RPE sono state messe in coltura in modo da formare un foglio monostrato
- i fogli di cellule RPE hanno espresso i marcatori RPE come RPE65, BEST1, MERTK, e CRALBP
- prima del trapianto i foglietti sono stati testati: dallo studio è emerso che la tumorigenicità dei foglietti di RPE è trascurabile
- il foglio di cellule 1.3x 3 mm è stato impiantato nell'occhio della paziente
- il trapianto non ha arrecato danni o complicazioni

# APPLICAZIONI IN AMBITO CLINICO

Studi successivi per generare i principali tipi di tessuto oculare a partire da cellule staminali pluripotenti indotte

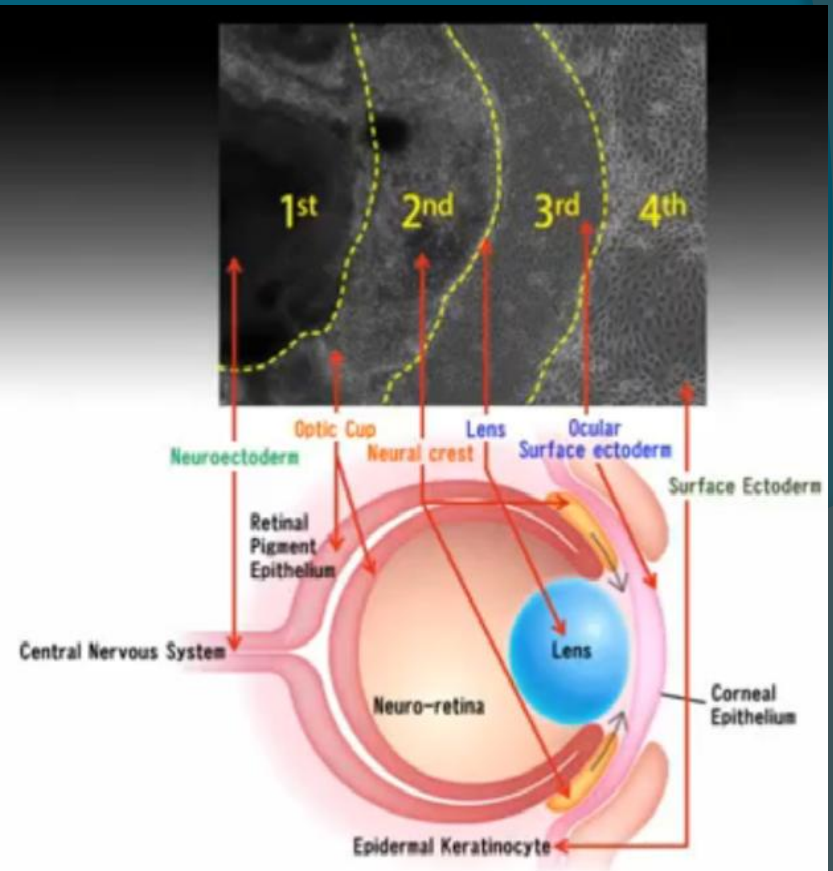
Lo sviluppo del tessuto oculare avviene in un modo che rispecchia lo sviluppo embrionale naturale dell'occhio. L'occhio è composto di tessuti altamente specializzati derivati da linee cellulari differenti.

Si è riuscito a stabilire un protocollo che permette di generare molteplici linee cellulari dei tessuti dell'occhio, tra cui la cornea, congiuntiva, cristallino, retina ed epitelio retinico pigmentato, a partire da cellule staminali pluripotenti indotte umane.

iPS

SEAM

Nella coltivazione *in vitro* secondo questa tecnica i tessuti generati si dispongono spontaneamente nelle quattro zone concentriche tipiche del modello di sviluppo naturale dell'occhio.



# Utilizzi delle cellule staminali

«Il governo è più papista del papa perché finanzia soltanto i progetti in cui si usano cellule staminali adulte, sebbene gli studi sulle cellule staminali embrionali siano legali purché «la distruzione degli embrioni non avvenga in Italia e le cellule siano importate dall'estero». Un bell'esempio di ipocrisia!»

Margherita Hack

# Problemi etici

## La legge 40 in Tribunale

Norme sulla fecondazione artificiale abbattute dai giudici



**Divieto di produzione di più di tre embrioni**

Rimosso dalla Corte Costituzionale nel 2009



**Obbligo di contemporaneo impianto di tutti gli embrioni prodotti**

Rimosso dalla Corte Costituzionale nel 2009



**Divieto di diagnosi preimpianto**

Rimosso dal Tar del Lazio nel 2008



**Divieto di fecondazione eterologa**

Giudicato ieri incostituzionale dalla Consulta



**Divieto di accesso alle coppie fertili ma portatrici di patologie genetiche**

In attesa di giudizio della Corte Costituzionale



**Divieto di accesso alla fecondazione assistita per single e coppie dello stesso sesso**

In vigore ma manca una legislazione di riferimento

*“should we stop this research?  
It’s too late! “*