

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Triennale in
Scienze Biologiche (L-13)



iPSCs: le potenzialità di una cellula riprogrammata

iPSCs: the potential of a reprogrammed cell

Tesi di laurea di:
Caterina Bruni

Docente referente:
Prof.ssa Oliana Carnevali

Sessione: Ottobre 2024
Anno accademico 2023/2024

LE CELLULE STAMINALI

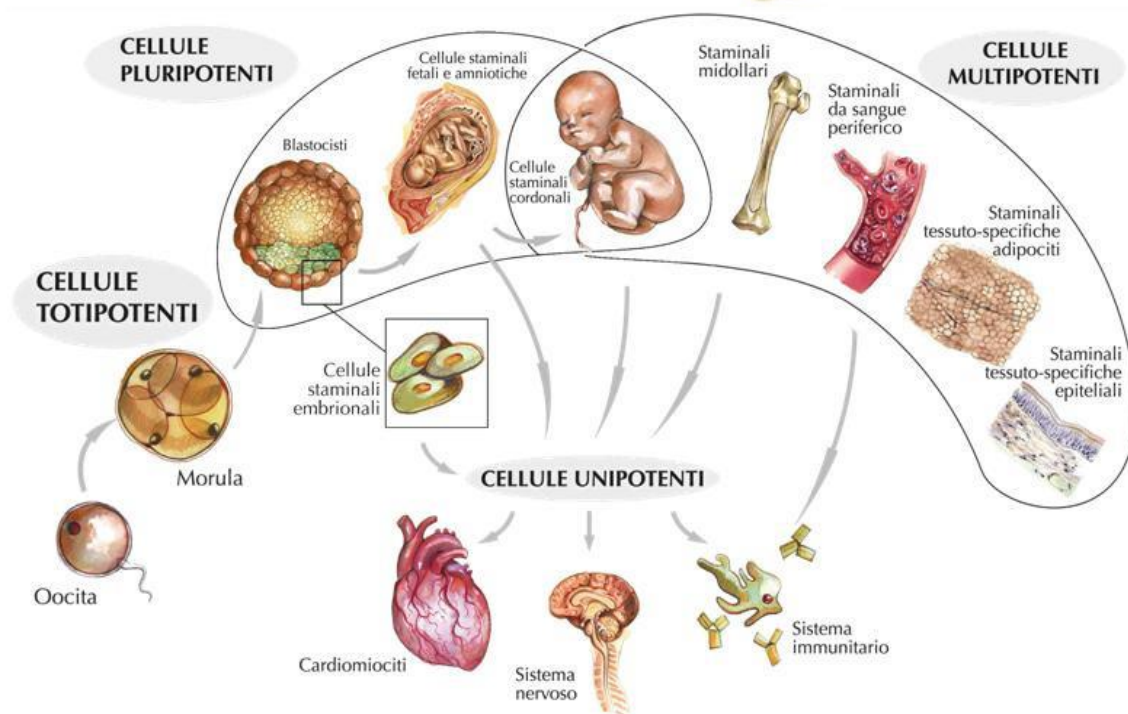
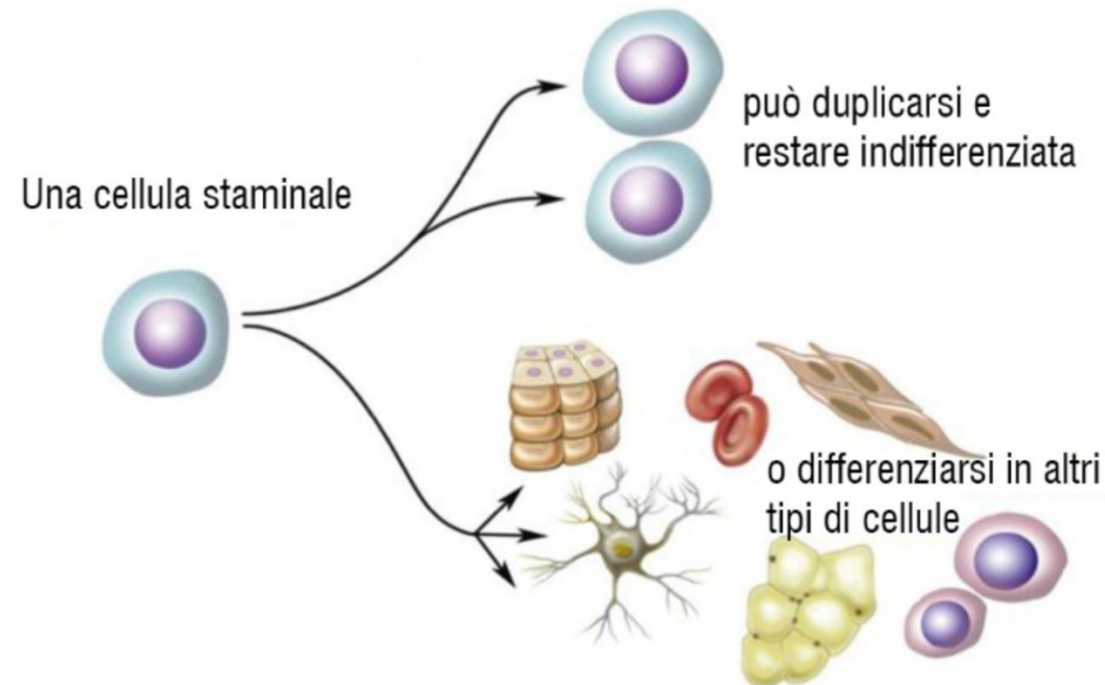
Sono cellule non specializzate che hanno la capacità di trasformarsi in altri tipi cellulari.

Due caratteristiche fondamentali:

- AUTORINNOVAMENTO

- POTENZA

- TOTIPOTENTI
- PLURIPOTENTI
- MULTIPOTENTI
- UNIPOTENTI



Caso di studio:



“Induzione di cellule pluripotenti da fibroblasti embrionali e adulti di topo attraverso fattori definiti”

Nel 2006 Shinya Yamanaka ha dimostrato che le **cellule della pelle possono essere riprogrammate in cellule pluripotenti indotte (iPSCs)** aggiungendo artificialmente quattro geni (denominati Yamanaka factors o geni OKSM).
La riprogrammazione potenzialmente ci permette di trasformare ogni cellula del nostro corpo in una cellula staminale pluripotente.
Le cellule iPSCs inoltre evitano molte questioni morali che accompagnano l'uso delle cellule staminali embrionali.

Scopo:

In questo studio, si è verificato se i fattori che avevano dimostrato di contribuire nel mantenimento della pluripotenza nelle cellule ES potessero indurre la pluripotenza nelle cellule somatiche (fibroblasti) adulte di topo.

Visualizzazione della pluripotenza:

Lo stato pluripotente viene visualizzato come resistenza al G418.

Inserita resistenza β geo nel gene Fbx15

24 fattori selezionati in totale

Introduzione nei fibroblasti embrionali di topo

RISULTATI:

Introduzione
singolo fattore

NESSUNA
COLONIA



Introduzione di
tutti i 24 fattori

22 COLONIE
RESISTENTI A G418

Delle 22 colonie, 5 MOSTRANO:

Morfologia simile a cellule ES: forma rotonda,
nucleoli grandi e scarso citoplasma

Proprietà di proliferazione simili a cellule ES

Il loro tempo di raddoppio era equivalente a
quello delle cellule ES (17 ore)

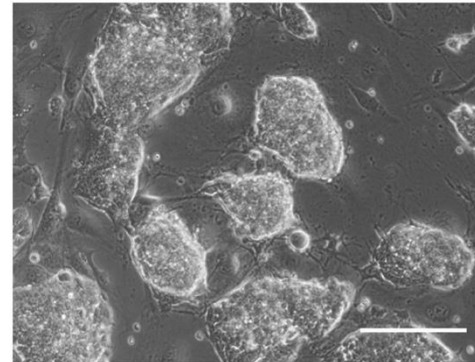
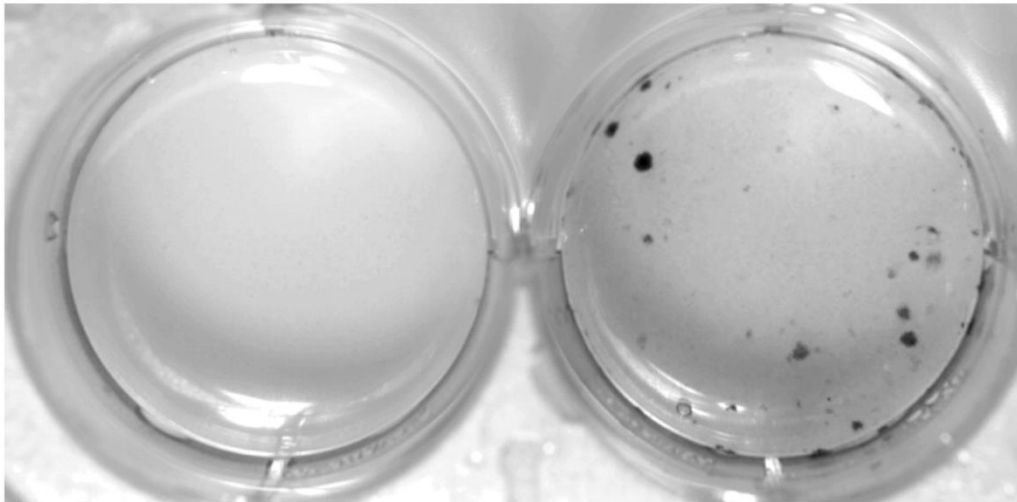
Mock

All factors

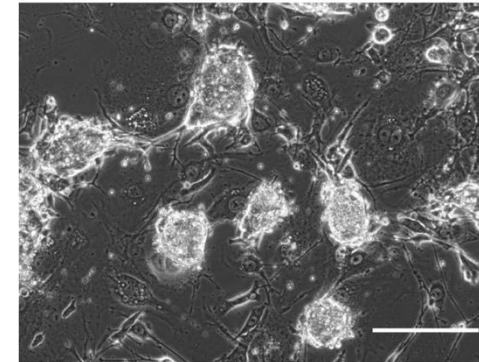
ES

iPS-MEF24-1-9

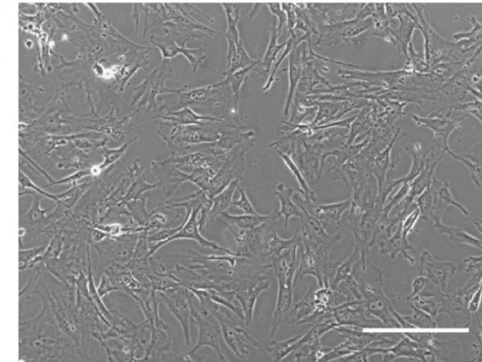
MEF



Staminali Embrionali



*Staminali Pluripotenti indotte da
fibroblasti embrionali di topo con la
trasduzione di tutti e 24 i fattori*



Fibroblasti Embrionali di topo

RISULTATI:

L'ESCLUSIONE ANCHE DI SOLO UNO DEI 4 FATTORI NON CONSENTE LA RIPROGRAMMAZIONE CELLULARE

Quali dei 24 fattori sono essenziali?

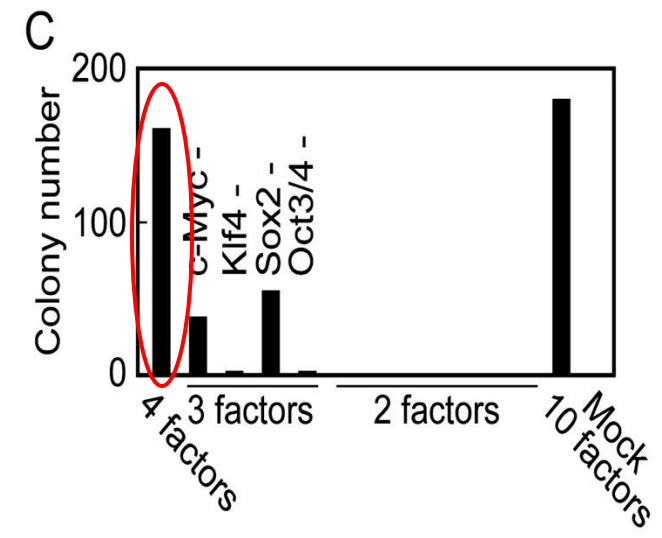
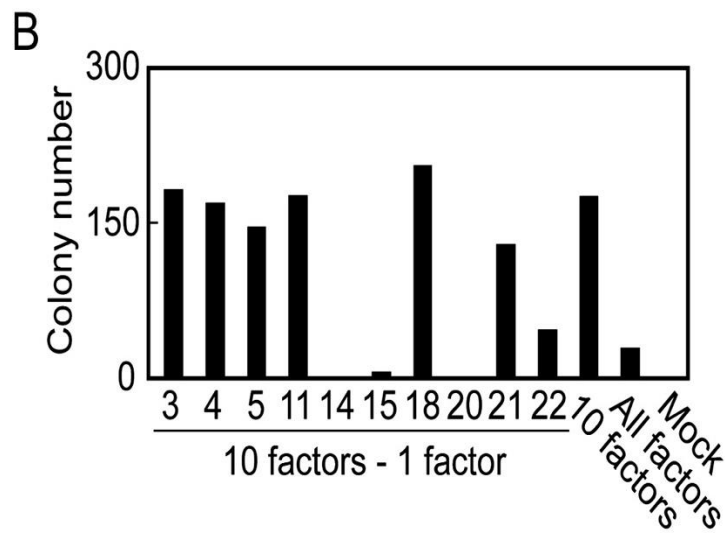
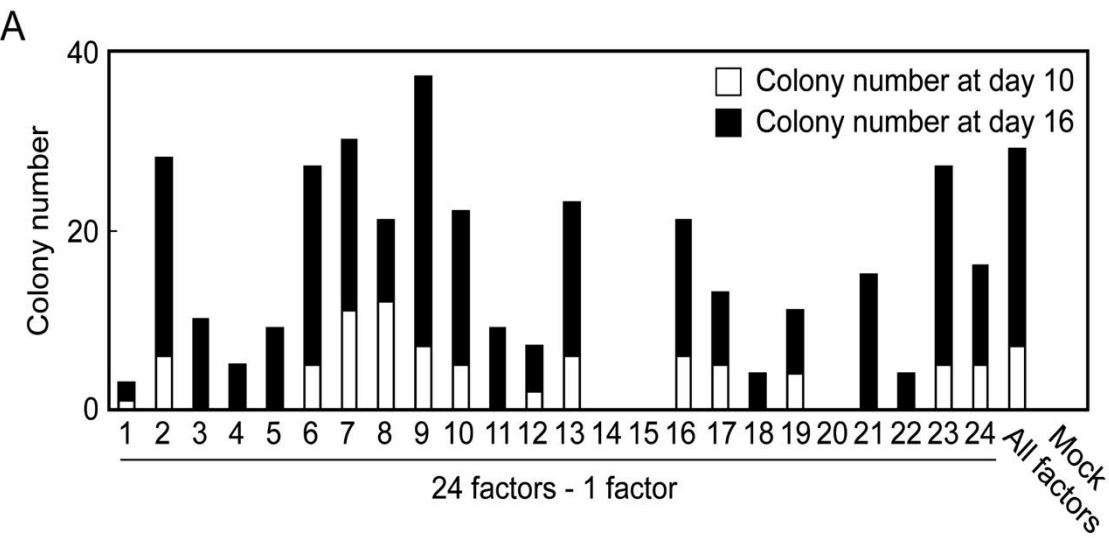
Ritiro dei singoli fattori dal pool

10 FATTORI

Quali dei 10 fattori sono essenziali?

Ritiro dei singoli fattori dal pool

Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc

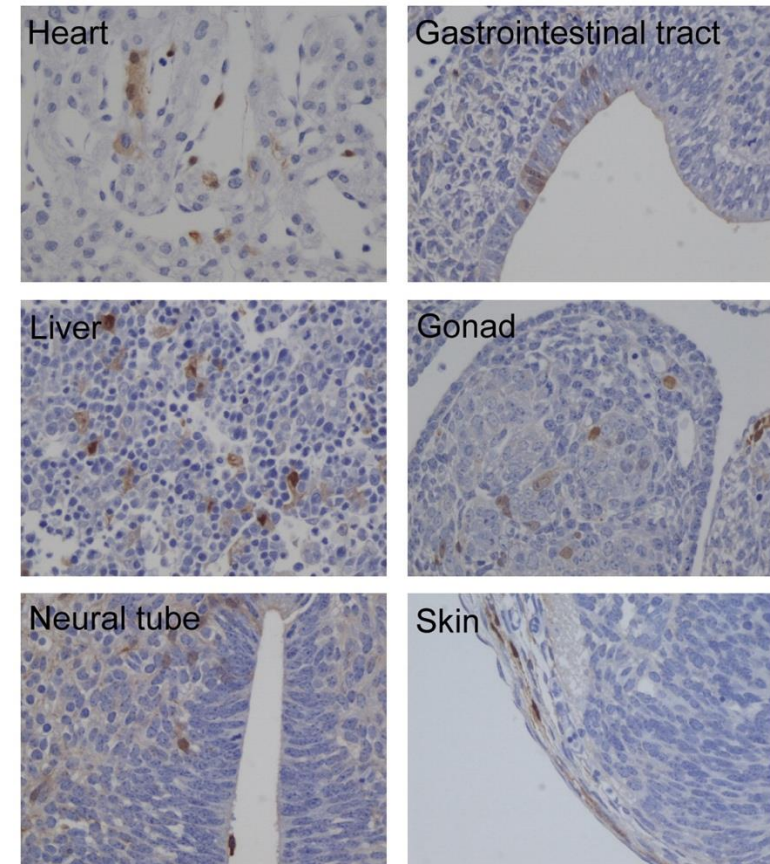
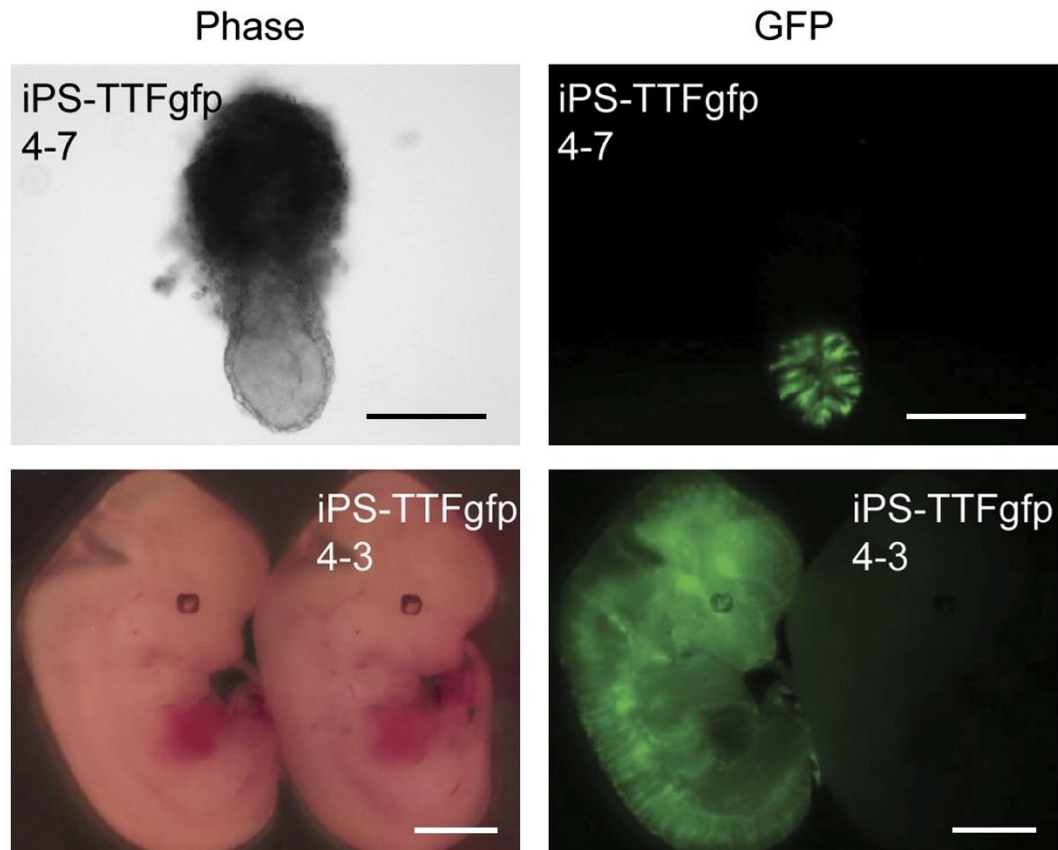


RISULTATI:

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

Le iPS-TTF (marcate con fluorescenza) vengono poi inserite nelle blastocisti mediante microiniezione: ottenuti 18 embrioni, 2 dei quali mostrano contributo positivo delle iPS positive a GFP (Green Fluorescent Protein).

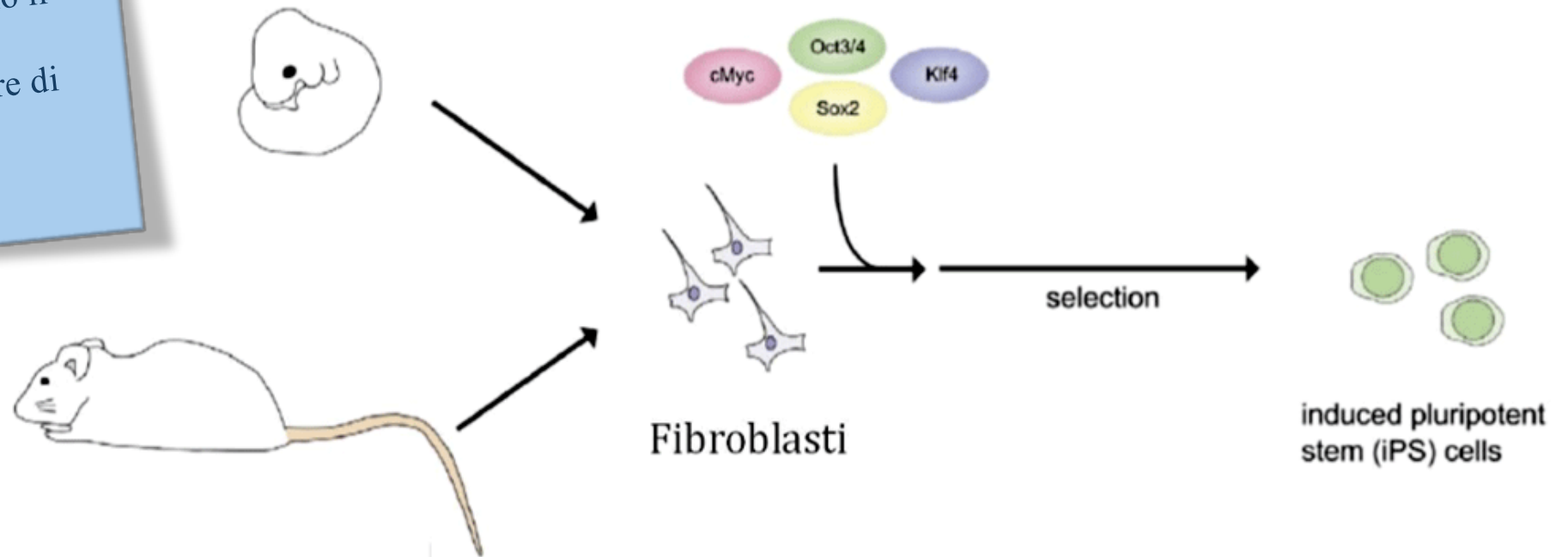
Le analisi istologiche hanno confermato che le cellule iPS hanno contribuito a tutti e tre i foglietti embrionali.



Oct3/4, Klf4, Sox2 e C-myc sono stati identificati come fattori di trascrizione essenziali per il mantenimento della pluripotenza.

I 4 fattori selezionati, inducono il differenziamento di cellule pluripotenti (iPSCs) da colture di fibroblasti di topo.

Conclusioni:





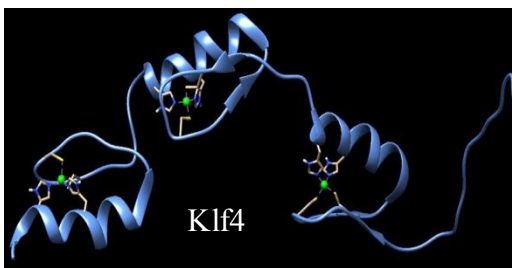
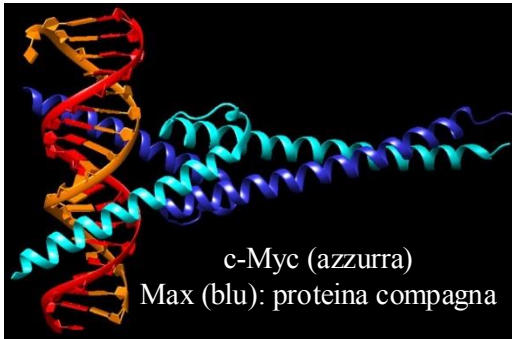
Oct3/4

Sox2

Yamanaka transcription factors

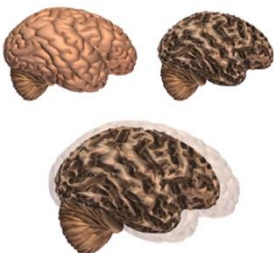
C-myc

Klf4

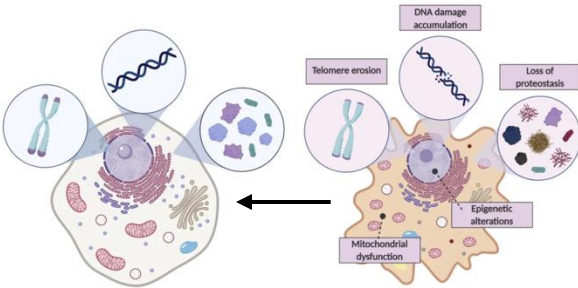


Future applicazioni:

Malattie neurodegenerative



Ringiovanimento



Cancro??



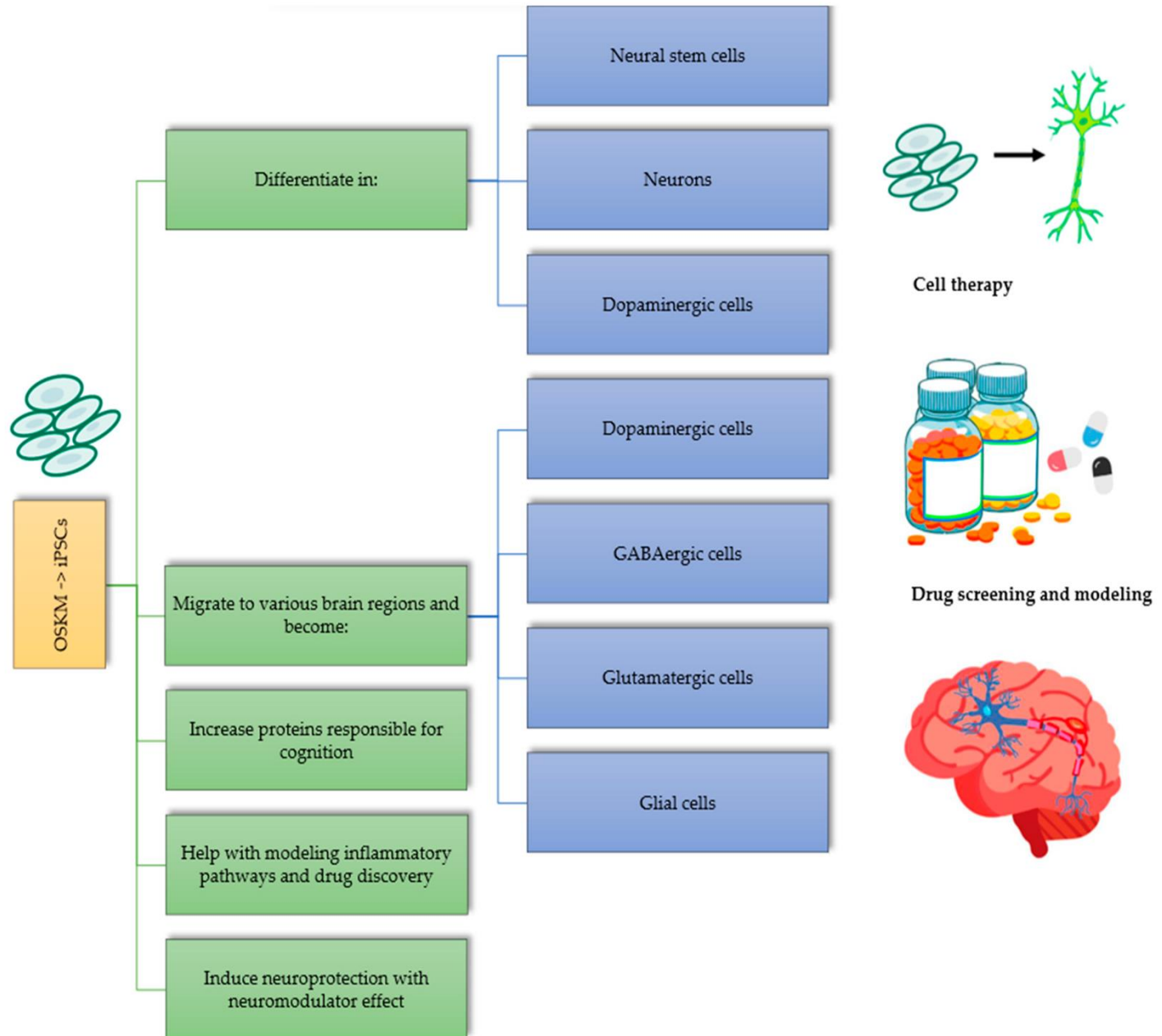
Malattie neurodegenerative

Produzione di cellule dopaminergiche nel caso della malattia del Parkinson.

Produzione di cellule neuronali per sostituire quelle colpite dall'atrofia olivopontocerebellare.

iPSCs per produrre motoneuroni per la SLA.

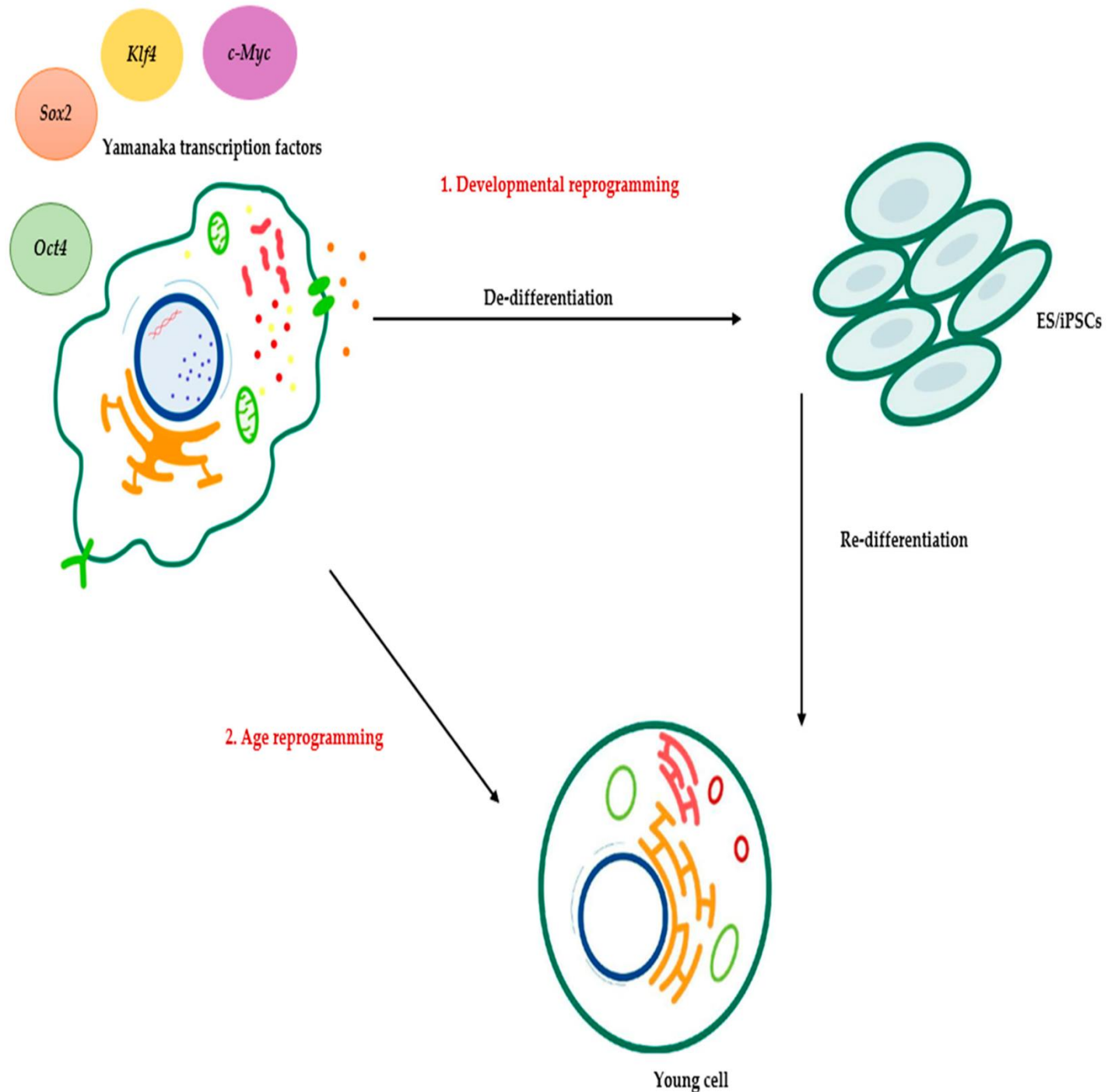
iPSCs si differenziano in diverse cellule cerebrali promuovendo la neuroplasticità cerebrale per la modellazione del morbo di Alzheimer.



Ringiovanimento

Ringiovanimento epigenetico:

CELLULE PARZIALMENTE RIPROGRAMMATE in cui non viene persa l'identità somatica, la cellula viene riportata ad uno stato più giovane senza completare il ciclo di riprogrammazione attraverso l'ESPRESSIONE TRANSITORIA DEGLI OSKM.



Cancro

Transizione delle cellule tumorali verso uno stato più simile a quello delle cellule staminali (diminuzione carica del tumore).

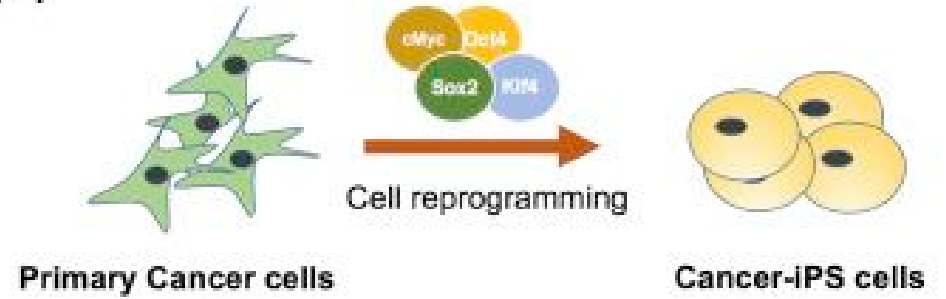
Eccessiva attivazione degli OSKM potrebbe portare ad un aumento dell'aggressività del tumore.



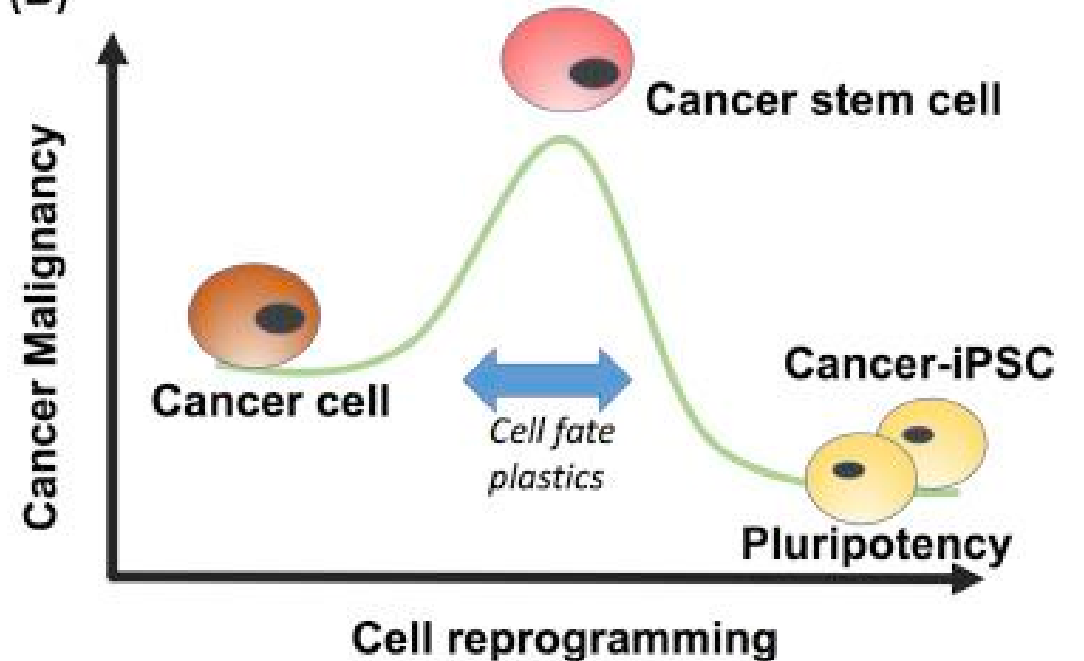
Problema?

**Cellule Staminali
Tumorali (CST)**

(A)



(B)



Bibliografia:

Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.

Aguirre, M.; Escobar, M.; Forero Amézquita, S.; Cubillos, D.; Rincón, C.; Vanegas, P.; Tarazona, M.P.; Atuesta Escobar, S.; Blanco, J.C.; Celis, L.G. (2023). Application of the Yamanaka Transcription Factors *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc* from the Laboratory to the Clinic. *Genes*, 14 (9), 1697.

Colombo, R., Olmo, E., Bacci, S., Canapa, A., Cimini, A. M., Cioni, C., Colasanti, M., Della Giovampaola, C., Deri, P., Ferri, D., Gornati, R., Liquori, G. E., Luparello, C., Nano, R., Odierna, G., Ottaviani, E., Panzica, G. C., Rosati, F., Rossi, A. R., Sciola, G. L., & Sinatra, F. (2014). *Biologia: cellula e tessuti* (2^a ed.). Edi-Ermes.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Riassunto

Le cellule staminali sono non specializzate e hanno due caratteristiche principali: l'auto-rinnovamento e la potenza, che consente loro di differenziarsi in vari tipi cellulari. Fino al 2006, si credeva che le cellule staminali embrionali (SE) fossero l'unica fonte di cellule pluripotenti. Shinya Yamanaka ha dimostrato che i fibroblasti della pelle possono essere riprogrammati in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) attraverso l'aggiunta di quattro geni noti come Yamanaka factors.

Il suo studio "**Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors**" mira a verificare se i fattori che mantengono la pluripotenza nelle SE possano essere utilizzati per indurre la pluripotenza nei fibroblasti di topo.

Per visualizzare la pluripotenza, si inserisce la resistenza β geo (resistenza al G418) nel gene Fbx15, essenziale per il mantenimento della pluripotenza nelle cellule staminali embrionali e nello sviluppo del topo.

Dopo aver identificato 24 fattori di partenza, vengono inseriti in fibroblasti embrionali e si formano 22 colonie resistenti al G418 di cui 5 mostrano morfologia, proprietà di proliferazione e tempo di raddoppio simile alle staminali embrionali.

Di questi 24 fattori se ne sono selezionati 4 essenziali (Oct3/4, Sox2, Klf4, C-myc) tramite ritiro dei singoli fattori dal pool.

Questi fattori sono stati inseriti in fibroblasti adulti, producendo iPSCs che sono state tracciate con fluorescenza e inserite in blastocisti. L'analisi ha confermato che le iPSCs hanno contribuito allo sviluppo embrionale, partecipando alla formazione di tutti e tre i foglietti embrionali.

Questa scoperta ha importanti implicazioni per applicazioni future in medicina, come il trattamento di cancro, delle malattie neurodegenerative e nel ringiovanimento cellulare.

Inoltre, offre una soluzione a molte questioni etiche legate all'uso delle cellule staminali embrionali.