

Sbobina 5 lezione (18-10-22)

Se nella prima parte del corso abbiamo parlato di cellule adulte, oggi trattiamo le fasi precoci dello sviluppo (prima della gastrulazione).

Cominciamo ripetendo le definizioni dei vari tipi di **potenziale differenziativo**:

Toti-, Pluri-, Multi-, Uni-potency

Totipotency: the ability of a single cell to divide and produce all the differentiated cells in an organism, including extraembryonic tissues. In mammals: zygote.

Pluripotency: the ability of a cell to differentiate into any of the three germ layers: **endoderm, mesoderm or ectoderm**. Pluripotent stem cells can give rise to any fetal or adult cell type. However, a single cell or a conglomerate of pluripotent cells cannot develop into a fetal or adult animal because they lack the potential to organize into an embryo. In mammals: Epiblast.

Multipotency: the ability of a cell to differentiate into a limited number of cell fates, usually within the same germ layer. In mammals: adult stem cells (progenitors) present in some adult tissues are multipotent.

Unipotency: the ability of a cell to differentiate into a single cell fate. In mammals: adult stem cells (progenitors) present in some adult tissues are unipotent.

Queste definizioni **non** si applicano solo alle cellule staminali.

La **totipotenza** è l'abilità di una singola cellula di dividersi e produrre tutte le cellule differenziate di un organismo, compresi i tessuti extraembrionali. Nei mammiferi, lo zigote è una cellula totipotente.

Parlando di totipotenza infatti, essa **non** è una proprietà delle cellule staminali: non vi sono cellule capaci di autorinnovamento illimitato, che siano anche totipotenti.

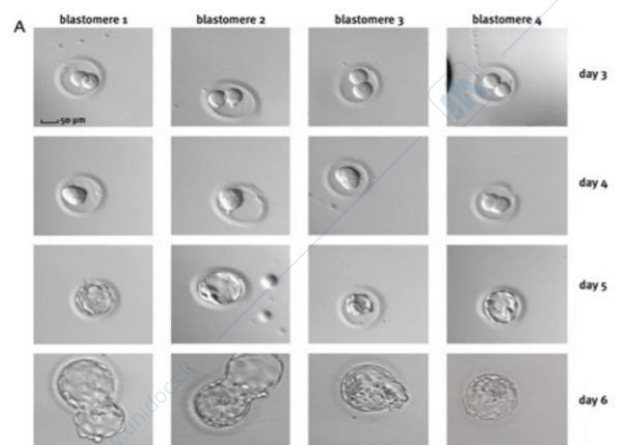
Come dimostro la totipotenza?

Tramite saggi funzionali.

Per dimostrare che fino allo stadio di quattro cellule i blastomeri sono totipotenti come lo zigote, basta separare o distruggere uno dei due blastomeri e vedere se l'altro da solo è in grado di generare un individuo.

I blastomeri infatti sono sì totipotenti, ma non sono cellule staminali (in quanto la progenie di questi blastomeri non è in grado in maniera illimitata di autorinnovarsi).

Totipotency in human

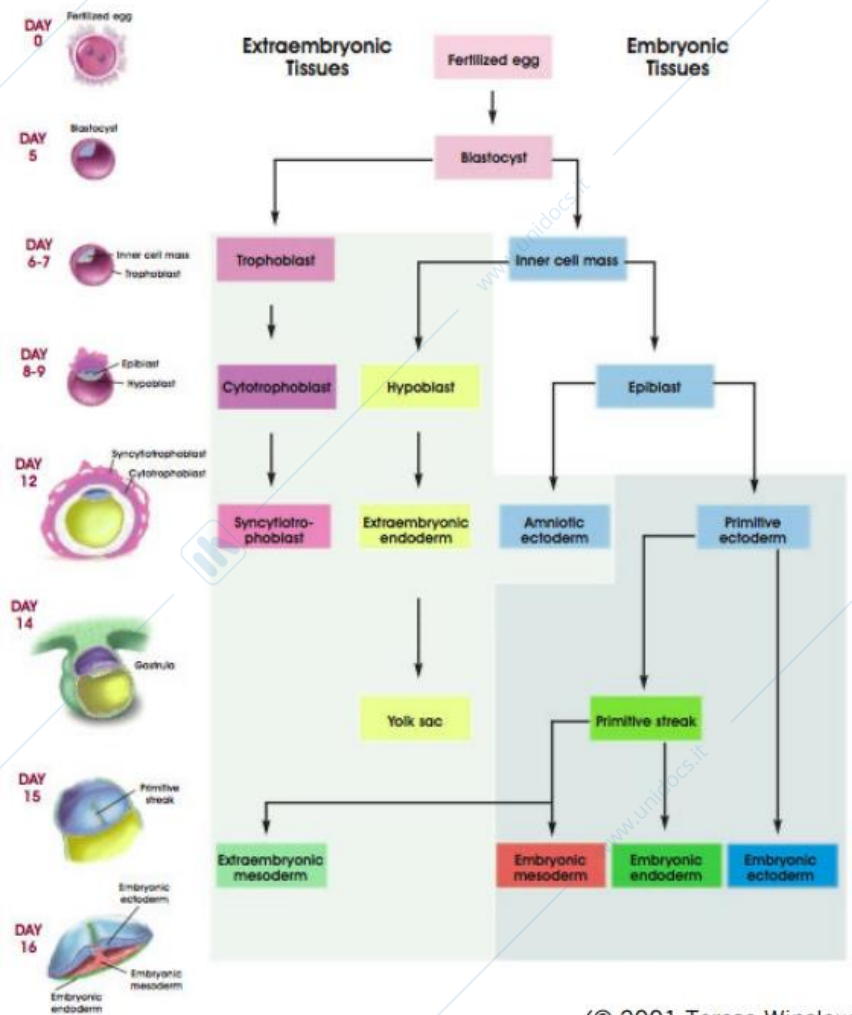


Van de Velde et al., 2008

(ovviamente per portare avanti l'esperimento devo ricreare le condizioni di sviluppo ottimali, proprie della specie: in vivo, nell'utero materno).

Andando più avanti nello sviluppo embrionale, le singole cellule della morula, separate dal resto dell'embrione, non sono in grado di generare un nuovo individuo. Tuttavia, se io dividessi a metà le cellule della morula, i gruppi di cellule ne sarebbero in grado: quindi la totipotenza, allo stadio di morula, è una proprietà della popolazione cellulare e non della singola cellula.

Successivamente, tra le 10 e le 40 cellule, avviene la formazione della blastocisti.



Primo evento differenziativo:

Da questo momento si generano due popolazioni che prendono due strade completamente diverse, a causa dell'adattamento dell'embrione alla vita intrauterina. Si forma uno strato più esterno di cellule detto **trofoectoderma** ed uno più interno chiamata **massa cellulare interna (ICM)**: da questa origineranno l'**epiblasto** e l'**endoderma primitivo**.

Post-impianto uterino, avviene la gastrulazione, attraverso la quale le cellule intraprenderanno destini differenziativi diversi per generare i tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma e endoderma) da cui derivano tutti i tipi cellulari dell'organismo adulto. Questo è un esempio di **pluripotenza** (capacità di una singola cellula, attraverso la sua progenie, di generare i derivati dei foglietti embrionali e la linea germinale, mentre **non** ha la capacità di generare le cellule degli annessi extraembrionali).

I derivati del mesoderma sono: cellule muscolari, cartilagine, tessuto osseo, sangue...

I derivati dell'endoderma sono quelli che costituiscono epitelio intestinale e respiratorio.

I derivati dell'ectoderma sono le cellule dell'epidermide, le cellule del SNC e le cellule germinali.

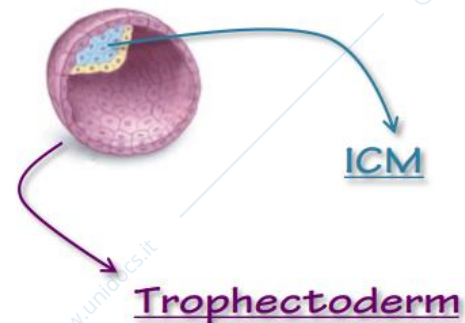
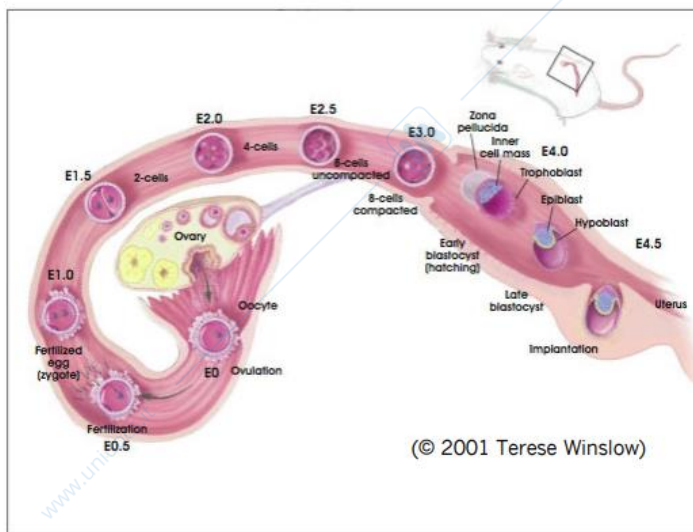
Quindi qual è la differenza tra pluripotenza e totipotenza?

La cellula totipotente forma anche i derivati extraembrionali, una cellula pluripotente no.

Il test funzionale per determinare la differenza tra totipotenza e pluripotenza prevede di isolare una cellula dell'epiblasto e, impiantandola nell'utero di una madre surrogata, vedere se si formerà un topo. Non accade, perché quella cellula autonomamente non è in grado di dare l'intero individuo.

Una cellula della massa cellulare interna, infatti, non potrà formare cellule del trofoectoderma.

Mouse Embryonic Development



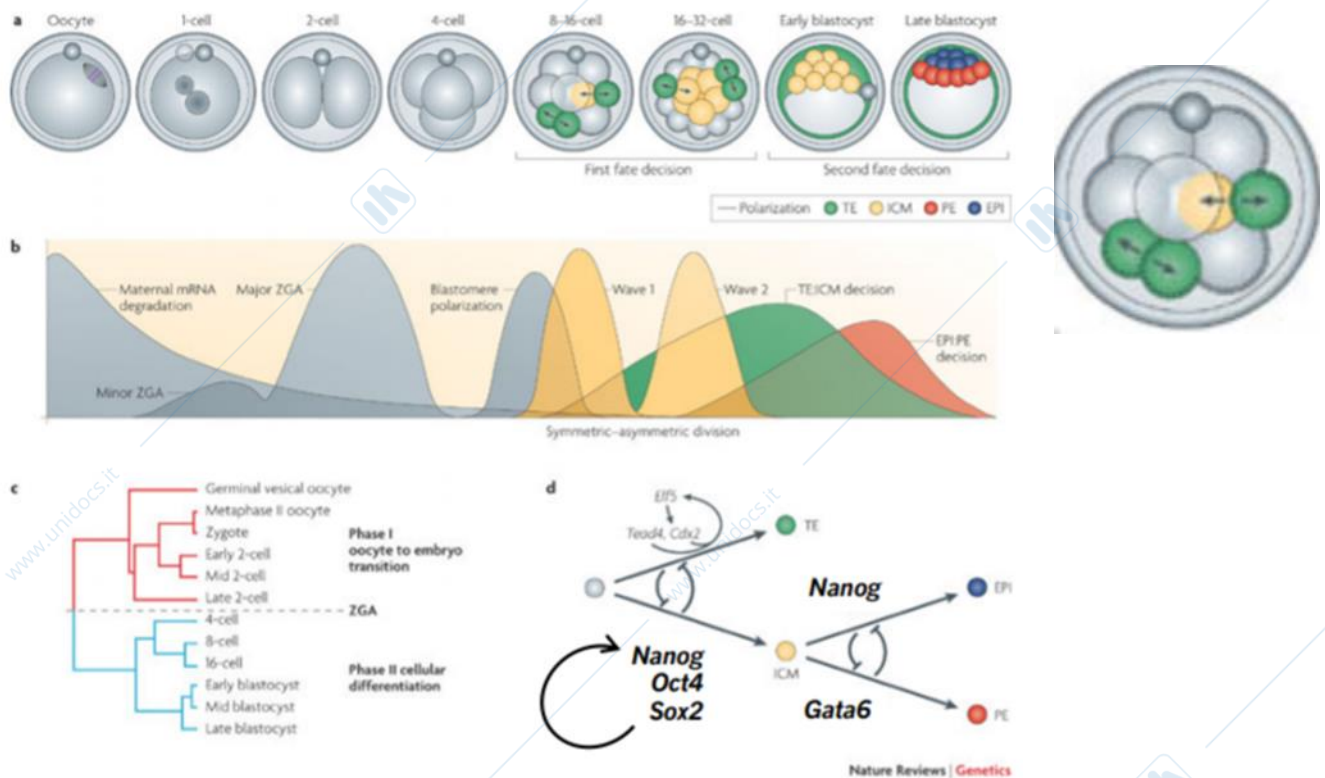
Dal momento della fecondazione (0.5) al momento dell'impianto (4.5) avviene il primo evento differenziativo che come detto è la suddivisione tra cellule della massa cellulare interna e le cellule del trofoectoderma.

Massa cellulare interna (ICM): come si forma?

Tutto il trascrittoma presente nell'embrione fino allo stadio di due cellule è composto da mRNA ereditato dalla cellula uovo (questo in realtà è un processo specie-specifico: stiamo parlando ora del topo).

Poi avverrà la cancellazione del trascrittoma materno per favorire l'attivazione del genoma zigotico (ZGA): affinché ciò avvenga, sono coinvolti dei microRNA.

Il processo di attivazione di geni avviene in due “ondate” (figura b):



La prima ondata è a livello dell’attivazione del genoma zigotico ed è uguale in tutte le cellule, per questo i due blastomeri sono equivalenti (stessa attivazione di geni).

Allo stadio di 16/32 cellule, alcune cellule (internamente alla Blastocisti, nello schema gialle) esprimeranno determinati geni; altre (che si trovano più esternamente nella Blastocisti, nello schema verdi) ne esprimono altri. Dal punto di vista cellulare questo è ovviamente un evento differenziativo.

Come avviene questo? Dobbiamo tornare al concetto di divisione simmetrica/asimmetrica:

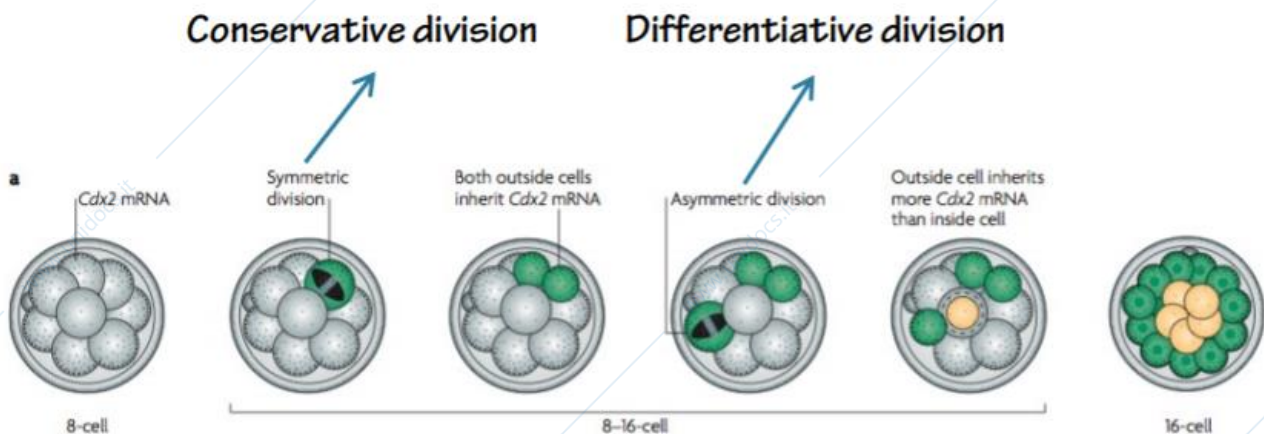
All’interno della morula inizialmente le cellule sono tutte equivalenti le une alle altre, ma ad un certo punto si devono attivare dei meccanismi molecolari che determinano una segregazione tra i due lineage in base alla posizione e attraverso l’utilizzo di divisioni asimmetriche. (quindi dei meccanismi che indirizzano delle cellule verso l’interno (massa cellulare interna) differenziandole da quelle che rimangono più esterne).

DIVISIONE SIMMETRICA:

Le 2 cellule colorate in verde in figura (pagina successiva), derivano da una cellula che si trova nella parte esterna dell’embrione che si divide. Il fuso mitotico (rappresentato da frecce divergenti) è **parallelo** rispetto alla superficie dell’embrione. Le 2 cellule figlie si troveranno quindi nella stessa posizione della cellula madre rispetto alla “sfera” (divisione conservativa).

DIVISIONE ASIMMETRICA:

L'altra cellula in verde a dx si è divisa formando una cellula che è rimasta più esterna e una cellula che si troverà invece all'interno della sfera (in giallo). In questo caso il fuso mitotico è **perpendicolare** rispetto alla superficie della "sfera". Una delle due cellule figlie rimane come la madre esternamente (in verde) mentre l'altra cellula figlia che si troverà all'interno sarà quindi in una posizione diversa rispetto a quella occupata dalla cellula madre (in giallo) (divisioni differenziali).



Quindi, l'orientamento del fuso mitotico è il segnale che spinge i due lineage cellulari a differenziarsi: a seconda dell'orientamento del fuso le cellule figlie si potranno trovare internamente o esternamente. Se si trovano esternamente saranno destinate a diventare trofoectoderma, se si trovano internamente saranno destinate a diventare massa cellulare interna.

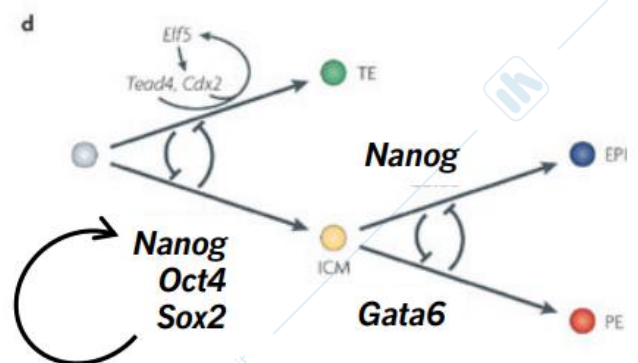
Come si correla questa differente modalità di divisione in una diversa attivazione di programmi di espressione genica all'interno delle cellule?

Vi è un mRNA codificante per il gene CDX2 che è fisicamente ancorato nella regione citoplasmatica, orientata verso l'esterno, della cellula madre. Se la divisione è simmetrica entrambe le cellule figlie ereditano la stessa quantità di questo mRNA. Se la divisione è asimmetrica, la cellula figlia che si troverà all'interno eredita meno mRNA codificante per CDX2 e la cellula figlia che si troverà rivolta all'esterno ne eredita la quasi totalità.

Cellula "verde" dopo la divisione posizionata verso l'esterno TE (eredita CDX2)

Il gene CDX2 produce ovviamente la sua omonima proteina. Cdx2 è un fattore di trascrizione e instaura un circuito autoregolativo a feedback positivo sulla sua stessa espressione: l'attivazione di una serie di geni regola positivamente la propria trascrizione. Cdx2 regola anche tutta una serie di altri geni che sono importanti per il trofoectoderma.

Inoltre, per il differenziamento della ICM è necessaria l'espressione di 3 importanti geni: Nanog, Oct4 e Sox2 che sono espressi dalle cellule che diventeranno massa cellulare interna ma non dalle cellule del trofoectoderma. Questo perché Cdx2, oltre ad attivare la propria espressione, è anche un repressore di Nanog, Oct4 e Sox2.



Quindi, le cellule destinate a diventare trofoectoderma, avendo ereditato maggiore quantità di mRNA di Cdx2, tengono attivamente spenta la trascrizione di Nanog, Oct4 e Sox2. Le cellule interne, non avendo l'espressione di Cdx2, attivano l'espressione di Nanog, Oct4 e Sox2.

Nanog, Oct4 e Sox2 sono considerati fattori master di regolazione in quanto in grado di regolare l'espressione di un grandissimo numero di altri geni, che sono quei geni che determinano differenziamento nel lineage "massa cellulare interna"; quindi a monte di una cascata regolativa.

Nanog, Oct4 e Sox2, che sono anch'essi fattori di trascrizione e a loro volta attivano la propria trascrizione con un circuito ad autoregolazione a feedback positivo e si influenzano reciprocamente: Sox2 attiva la trascrizione di Nanog, Oct4 e anche di se stesso. A loro volta Nanog, Oct4 e Sox2 che sono geni codificanti per fattori trascrizionali reprimono la trascrizione di Cdx2 e tutta una serie di altri geni del trofoectoderma. Quindi, c'è un'inibizione anche in senso opposto.

Questi due meccanismi, l'autoregolazione a feedback positivo e l'inibizione reciproca, compongono insieme un interruttore molecolare semplice ma estremamente efficace.

La divisione unidirezionale dei due lineage avviene molto rapidamente.

(come vedremo nelle prossime lezioni, questi meccanismi che mantengono accesi o spengono determinati geni si basano su modifiche epigenetiche su code istoniche o su DNA nelle isole CpG, questi fattori cooperano con modificatori come metiltransferasi ecc)

Un secondo evento differenziativo importante (second fate decision) porta le cellule della massa cellulare interna a generare 2 lineage interni alla blastocisti: l'**epiblasto** e l'**endoderma primitivo**.

Le cellule dell'epiblasto continuano ad esprimere il gene Nanog. Le cellule dell'endoderma primitivo, invece, spengono Nanog e attivano un altro gene che si chiama **Gata6** (e Gata 4). Sono tutti geni codificanti per fattori trascrizionali. Nanog e Gata6 si reprimono reciprocamente e attivano la propria stessa trascrizione, mediando la decisione sul destino differenziativo da intraprendere.

(Precisiamo che Nanog, dopo la gastrulazione, non viene più espresso).

A questo punto avviene l'impianto nell'utero materno che porta immediatamente all'evento di gastrulazione, dove le cellule dell'epiblasto si muovono e scambiano segnali anche con le cellule dell'ambiente circostante, cioè con le cellule dei tessuti extra-embryonali che si stanno a loro volta formando, e intraprendono il percorso differenziativo che le porterà a diventare mesoderma, ectoderma e endoderma (in seguito alla gastrulazione quindi non esistono più le cellule dell'epiblasto, ma le cellule derivanti da queste sono differenziate nei 3 diversi foglietti embrionali, ognuno dei quali non può formare cellule che appartengono ad un altro dei foglietti).

Le cellule dell'epiblasto sono cellule pluripotenti, mentre non lo erano quelle del trofoectoderma e non lo sono quelle dell'endoderma primitivo.

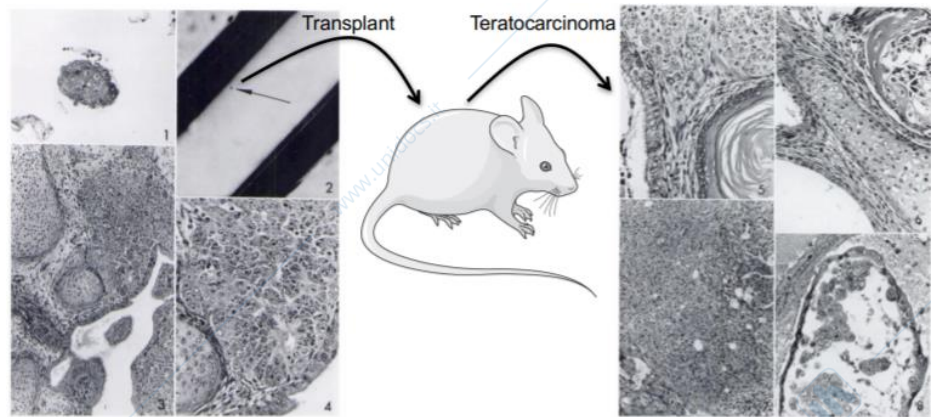
Quindi, ciò che ci interessa è la **stretta finestra di tempo in cui vi è pluripotenza**: tra la formazione della blastocisti e la gastrulazione. È importante sottolineare che le cellule dell'epiblasto **non** sono cellule staminali, in quanto durante il loro normale sviluppo, la loro esistenza come cellule indifferenziate pluripotenti si ferma alla gastrulazione. Dopo la gastrulazione possiamo trovare al massimo delle cellule multipotenti.

(le cellule staminali sono definite adulte solo per definizione, si trovano infatti anche nel bambino appena nato, con adulte si intende che sono presenti per tutta la vita dell'organismo nei diversi tessuti, spesso sono anche dette cellule staminali tessuto specifiche).

Detto ciò, esiste un modo per derivare delle cellule staminali che siano anche pluripotenti isolando delle cellule dal momento della blastocisti pre-impianto, portando alla formazione delle **cellule staminali embrionali**.

CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

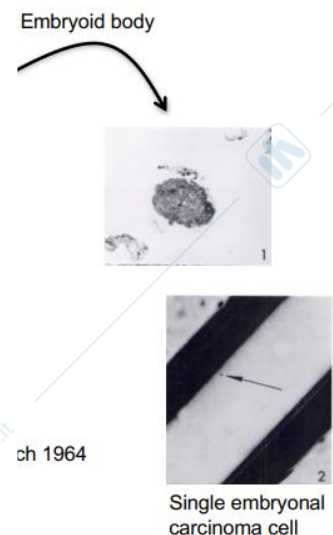
La scoperta delle cellule staminali embrionali è stato un processo graduale che però poi ha portato anche a un premio Nobel per gli autori coinvolti (Evans, Kaufman e Martin).



Negli anni '50 alcuni ricercatori erano particolarmente interessati al teratocarcinoma: un particolare tipo di tumore embrionale, cioè che si forma nell'utero materno e si origina a partire da cellule della linea germinale. La caratteristica particolare è che se facciamo un'analisi istologica di questo tumore troviamo tessuti appartenenti ai 3 foglietti embrionali ma tutti mischiati tra di loro, totalmente disorganizzati (denti, porzioni di pelo ecc).

Per questi ricercatori la cosa interessante è che i teratocarcinomi sono tumori trapiantabili da topo a topo, ovvero cellule del tumore di un topo possono essere inserite in un secondo generando così nuovi teratocarcinomi contenenti gli stessi tipi cellulari del tumore del primo topo (ovviamente la forma del teratocarcinoma potrebbe essere diversa ma la composizione in tessuti sarà la stessa).

Riuscirono anche a crescere in coltura, in laboratorio, le cellule di questi tumori. Esperimento degli anni '60: dal teratocarcinoma coltivano in piastra delle cellule che, in laboratorio, formano dei **corpi embrionali** (aggregati di cellule derivanti dal tumore del topo). Alcune delle cellule del teratocarcinoma riescono infatti a sopravvivere in coltura e hanno la capacità di formare delle strutture composte da più cellule al cui interno di nuovo si ritrovano alcuni tipi cellulari appartenenti ai derivati dei 3 foglietti embrionali. Questo tipo di differenziamento *in vitro* avviene a partire anche da singole cellule del carcinoma embrionale (teratocarcinoma). Queste cellule vengono chiamate *embryonal carcinoma cell*, cioè cellule del carcinoma embrionale.



Questi ricercatori riescono a isolare quindi una singola cellula a partire da questi corpi embrionali, trapiantare una singola cellula all'interno di un topo ospite e in questo topo osservano la formazione di un nuovo teratocarcinoma. In questo modo si dimostra che **una singola cellula** derivata dal teratocarcinoma è una cellula pluripotente e non il tumore in quanto popolazione cellulare.

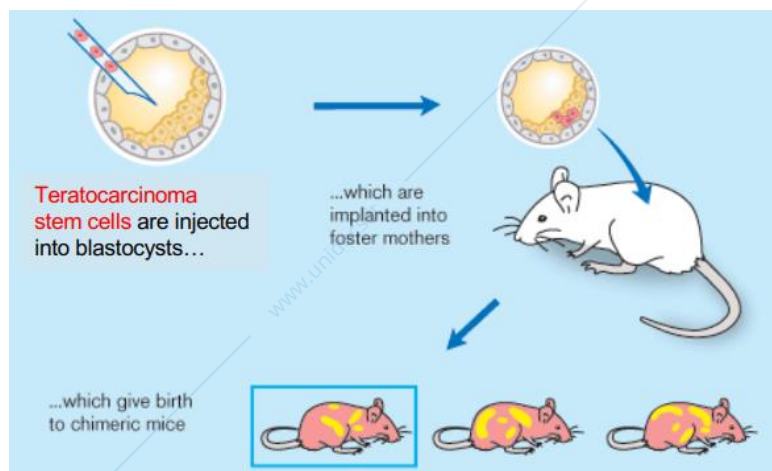
Questo esperimento ricorda un po' il saggio funzionale di cui parlammo per testare le staminali ematopoietiche adulte (isolandone una e trapiantata da un topo A in un topo B, se nel sangue del topo B si osservano globuli rossi, linfociti, granulociti ecc derivati dalla cellula trapiantata abbiamo dimostrato che quella è una cellula staminale ematopoietica). Questo caso è esattamente identico, solo che la cellula non viene messa in una nicchia specifica, ma in qualunque zona del corpo (tipicamente sotto la pelle) venga trapiantata in quell'ambiente genererà derivati dei 3 foglietti embrionali. Quindi le cellule del carcinoma embrionale sono cellule pluripotenti.

Un'ulteriore dimostrazione viene da un esperimento che si chiama **"generazione di topo chimerico"**.

Che cos'è una chimera?

Il topo chimerico è un topo formato dall'unione di due topi. All'interno di una blastocisti si possono iniettare delle cellule di teratocarcinoma che si integrano solo a livello della massa cellulare interna. Questa blastocisti viene impiantata nell'utero di una madre surrogata. Il topolino figlio sarà un cosiddetto topo chimerico, ossia è un topo che avrà per ogni tessuto cellule derivanti dalla massa cellulare interna della blastocisti ospite e cellule derivanti dall'iniezione all'interno della blastocisti, cioè cellule derivate dal teratocarcinoma.

Questa cosa è ben visibile se prendiamo in esame il colore del pelo del topo. Un topo chimerico generato da una blastocisti di una linea di topi con colore bianco del pelo dentro la quale sono state iniettate delle cellule derivate dal teratocarcinoma di un topo con colore del pelo nero avrà, a livello del mantello, chiazze bianche e chiazze nere.



Ma se volessi sezionare questo topo per dimostrare che la stessa cosa è vera anche negli altri organi, come potrei fare? Posso marcare le cellule con un gene reporter. Siccome queste cellule del carcinoma embrionale possono essere coltivate in laboratorio, possono anche essere modificate. Potrei inserire il gene codificante per la GFP, una proteina verde fluorescente, all'interno del genoma di queste cellule e vedere se all'interno di ogni singolo organo di questo topo chimerico si osservano gruppi di cellule verdi fluorescenti.

Domanda ricorrente all'esame: che promotore utilizzereste per guidare l'espressione di questo gene reporter? Un gene reporter è sequenza codificante per una proteina di facile identificazione, però devo scegliere quale promotore utilizzare. Utilizzereste un promotore tessuto-specifico o un promotore di un gene housekeeping? Si usa il **promotore di un gene housekeeping**, in modo tale che tutte le cellule

siano permanentemente marcate e quindi in qualsiasi organo cada il mio interesse io posso fare la sezione e vedere se ci sono questi gruppi di cellule.

Cosa ci dice questo esperimento? Che le cellule del carcinoma embrionale iniettate all'interno di questo ambiente (la blastocisti) prendono parte allo sviluppo embrionale contribuendo alla formazione di organi, tessuti, tipi cellulari, derivati dei 3 foglietti embrionali.

Se direttamente impiantassi una di queste cellule nell'utero materno e non nella blastocisti, non si formerebbe un topo figlio. Solo se queste cellule sono poste all'interno di una blastocisti, quindi messe nelle condizioni di poter esprimere la loro **pluripotenza**, formano i derivati dei 3 foglietti embrionali.

La sottile differenza tra totipotenza e pluripotenza è proprio qui.

Tutto questo viene riassunto dagli autori in schemi tipo questo. Nello schema abbiamo teratocarcinoma, un tumore isolato da alcuni topi. Da questo teratocarcinoma, tramite coltura *in vitro*, si possono ottenere cellule staminali del teratocarcinoma (*teratocarcinoma stem cell line*) le quali hanno delle proprietà interessanti. Prima proprietà è quella di formare, tramite iniezione sottopelle in un topo adulto, un nuovo teratocarcinoma, anche facendo l'iniezione con una singola cellula. Il fatto di dare origine ad un tumore dimostra la capacità di queste cellule di generare i derivati dei 3 foglietti embrionali.

La stessa cosa queste cellule la possono fare se le lasciamo differenziare *in vitro* in laboratorio dove formeranno i corpi embrionali. Se iniettate all'interno di una blastocisti queste cellule prendono parte allo sviluppo di un topo, che sarà un topo chimerico. Quindi possono differenziare generando i derivati dei 3 foglietti embrionali anche nel contesto di una normale blastocisti formando un topo "senza tumori", un topo chimerico senza però teratocarcinomi. Un'altra cosa che hanno visto è che mettendo una blastocisti in un sito extra-uterino, queste blastocisti sviluppavano teratocarcinomi.

Quindi, nascevano tutta una serie di domande:

- il teratocarcinoma contiene delle cellule che sono differenziate (si possono trovare dai capelli ai denti in questi tumori), ma contiene anche delle cellule che hanno potenziale differenziativo, cioè hanno cellule che possono differenziare in derivati dei 3 foglietti embrionali, quindi contengono anche cellule pluripotenti.
- Queste cellule se messe in un contesto normale di una blastocisti erano sì cellule neoplastiche (cellule derivate da un tumore) ma prendono parte al normale sviluppo embrionale di un topo.

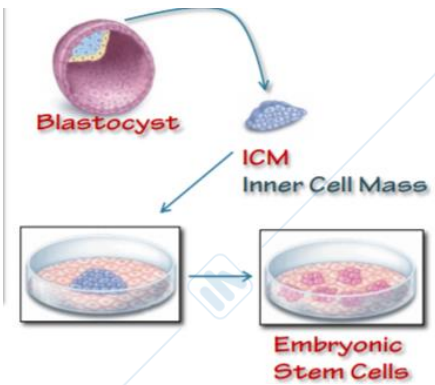
Quindi, se coltivassi *in vitro* una blastocisti, così come coltivo *in vitro* un teratocarcinoma, posso isolare delle cellule pluripotenti da una normale blastocisti che posseggono le stesse proprietà?

È possibile. Ed è il lavoro che ha portato poi al premio Nobel per questi autori nel 1981.

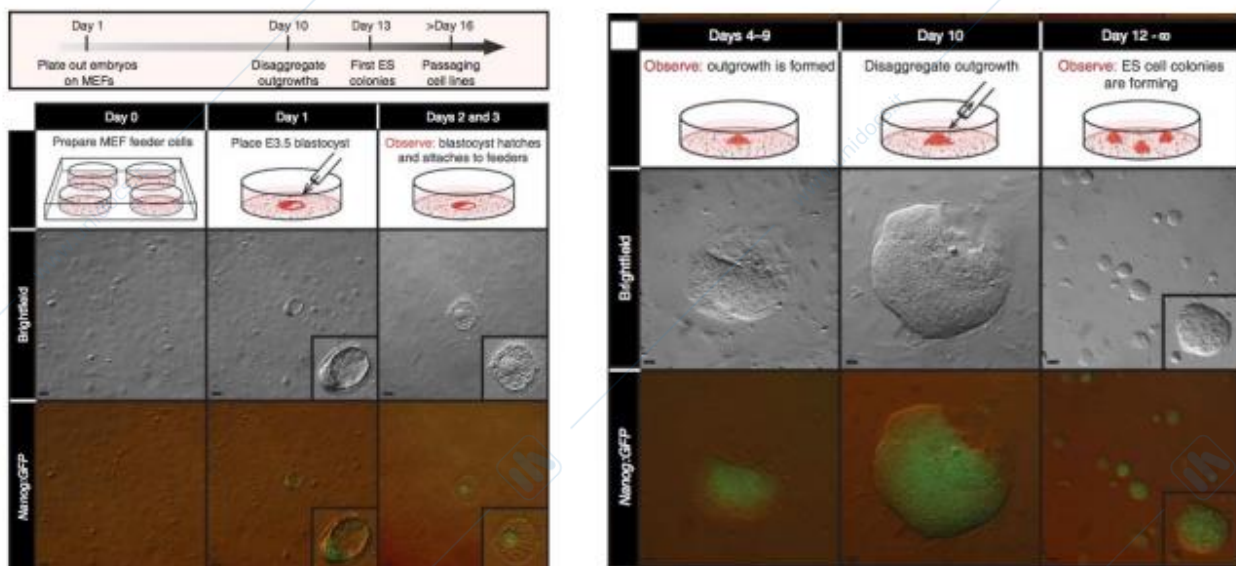


FIG. 1. Relationship between normal embryos and teratocarcinoma stem cells. Adapted from Martin (10).

Evans, Kaufman e Martin hanno preso delle blastocisti normali di topo prima dell'impianto, le hanno coltivate in laboratorio e da queste blastocisti isolano delle colture di cellule dette di **cellule staminali embrionali** che sono derivati dell'epiblasto della massa cellulare interna.



Le cellule isolate sono state messe su uno strato di cellule nutrici (*feeder*), fibroblasti embrionali di topo. È stato usato il sistema reporter in cui c'è il promotore del gene *Nanog*: espresso nella massa cellulare interna, quindi non più un promotore *housekeeping*, è importante sottolineare che *Nanog* viene espresso solo quando abbiamo l'epiblasto, nella gastrulazione invece non viene più espresso; quindi, finché viene espresso questo gene reporter sappiamo di star osservando cellule dell'epiblasto. Questo sistema prevede che questo promotore guidi l'espressione di una *GFP*: in fluorescenza vedremo che questa massa di cellule è verde, mentre non è verde il trofoectoderma. Dopo un paio di giorni la blastocisti aderisce fisicamente alle cellule nutrici e si allarga; queste cellule continuano a moltiplicarsi. A questo punto si può disaggregare questa colonia in gruppi più piccoli prelevandoli e mettendoli in un'altra coltura possiamo vedere che da ognuno di questi si formano nuove colonie di cellule che crescono in dimensioni e che mantengono l'espressione del gene reporter perché sono ancora verdi in fluorescenza. (posso continuare a fare questo all'infinito).



In altri termini, da una blastocisti è possibile isolare una popolazione di cellule in attiva proliferazione con capacità di auto-rinnovamento illimitata che mantengono l'espressione di un gene (*Nanog*) che sappiamo essere un gene caratterizzante dell'epiblasto, che è il gruppo di cellule pluripotenti della blastocisti.

La particolare linea di topo usata è la **strain/linea 129**. I topi *strain* sono topi gemelli, geneticamente identici l'un l'altro. Questo è utile perché, se voglio fare un esperimento, devo avere un controllo. Il

controllo, se è geneticamente diverso rispetto al primo topo non funziona, potrebbe dare informazioni sbagliate. Quindi, quando si fanno esperimenti con i topi si deve usare sempre la stessa linea di topo. Ne esistono a decine disponibili per la comunità scientifica che racchiudono appunto individui (topi) tutti geneticamente identici fra loro.

Oltre a questi fibroblasti, una componente essenziale per mantenere in coltura queste cellule staminali embrionali di topo (mESCs = mouse Embryonic Stem Cells) è il siero. Il siero è un derivato del sangue, di solito si usa quello di origine bovina. Facendo questa procedura, si può mantenere in coltura una popolazione di cellule che ha una capacità illimitata di auto-rinnovamento.

Riassumendo, quali sono quindi le condizioni di coltura utilizzate per derivare cellule che mantengono le proprietà delle cellule staminali embrionali?

- Linea di topo usata: **strain/linea 129**
- Cellule isolate messe su uno strato di **cellule nutrici (feeder)**, fibroblasti embrionali di topo
- **Siero fetale di origine bovina**

Grazie a queste condizioni di coltura questi ricercatori riescono quindi ad isolare le cellule di epiblasto, mantenerle in laboratorio come popolazione di cellule che mantiene la stessa caratteristica del tessuto di origine di differenziare, ma che allo stesso tempo acquisisce in vitro una proprietà che in vivo non ha, ovvero l'auto-rinnovamento. È proprio per questo che in vitro possiamo definirle cellule staminali embrionali.

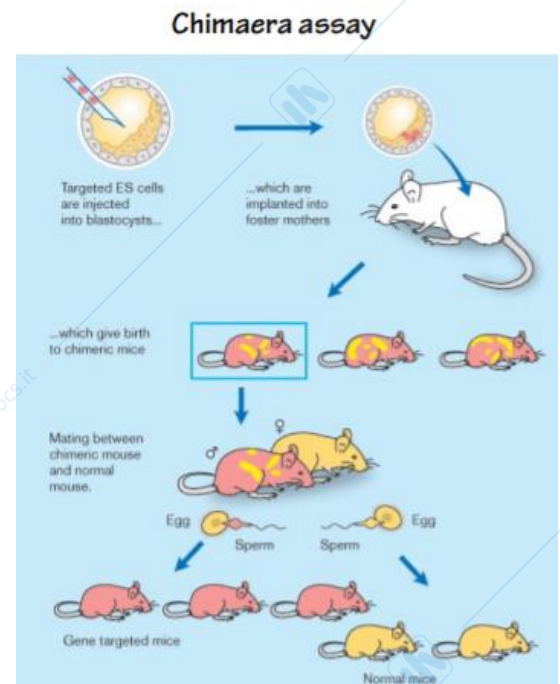
Come facciamo a dimostrare che è vero autorinnovamento e non semplicemente una divisione cellulare? Se è autorinnovamento devono mantenere le proprietà delle cellule madri, quindi la pluripotenza, quindi:

Come si può testare sperimentalmente la pluripotenza?

Se abbiamo cellule staminali embrionali possiamo usare dei **saggi di pluripotenza**. Sono saggi funzionali che vengono anche applicati nelle cellule del carcinoma embrionale.

1. Il primo saggio di pluripotenza è la **differenziazione in vitro**: coltivo le staminali embrionali di topo con le cellule nutrici e il siero bovino, poi tolgo una delle due componenti dalle condizioni di coltura (ad es. le nutrici) e vedo se queste spontaneamente differenziano formando i corpi embrionali. Esattamente come facevano le cellule del teratocarcinoma. Quindi se prendo le cellule indifferenziate, le posso separare meccanicamente dalle cellule nutrici e coltivarle in sospensione.
2. Il secondo test è la **formazione del teratoma (saggio del teratoma)**: stessa cosa che facevo con le cellule del teratocarcinoma, prendo le cellule staminali embrionali le inietto sotto la pelle del topo adulto e, pur non essendo cellule cancerose perché derivano da blastocisti normale, controllo che riescano a generare questi tumori con ammassi di cellule con caratteristiche dei 3 foglietti embrionali (quindi metto queste cellule in un ambiente che non è il normale ambiente di sviluppo ma non è neanche un ambiente che le mantiene indifferenziate).

3. Il terzo test è la **formazione del topo chimerico**: anche questo già visto per le cellule del teratocarcinoma. Se inietto delle staminali embrionali marcate con un gene fluorescente in una blastocisti ospite si forma poi, in seguito ad impianto nell'utero, un topo chimerico che riconosco grazie al colore del pelo. Tramite il gene fluorescente posso verificare questa cosa anche negli organi interni. In questo caso sorge la prima differenza con le cellule del teratocarcinoma in quanto se prendo questo topo chimerico e lo incrocio con un topo normale, il topo chimerico può fecondare il topo normale. Gli spermatozoi di questo topo chimerico possono essere o derivati dalla massa cellulare interna della blastocisti ospite originale oppure dalle cellule staminali embrionali che ho iniettato all'interno di questa blastocisti. Nel momento in cui avviene questo incrocio, se lo spermatozoo aveva il gene per la GFP integrato tutte le cellule del topo che nascerà da questo incrocio esprimeranno la GFP. Questo saggio ci dice che le staminali embrionali non solo possono formare un topo chimerico, ma questo topo chimerico è fertile e può trasmettere attraverso la linea germinale la progenie delle staminali embrionali iniettate all'interno della blastocisti ospite. Per le cellule del teratocarcinoma questa cosa non si verifica.



4. Il quarto test è la **complementazione di una blastocisti tetraploide**: si parte da uno zigote, avviene la prima divisione, si formano 2 cellule diploidi e tramite impulso elettrico si fondono insieme queste cellule formando di nuovo un'unica cellula ma tetraploide ($2n+2n=4n$). Questa cellula $4n$ può andare incontro a divisioni, ovvero formare una blastocisti che però sarà una blastocisti tutta composta da cellule tetraploidi.

La tetraploidia non è però compatibile con lo sviluppo dell'embrione. Tuttavia si forma comunque una struttura extra-embryonale che è la placenta perché la tetraploidia è "ammessa" nelle cellule del trofoectoderma. Quindi, la blastocisti tetraploide di per sé non è in grado di formare un embrione ma è in grado di formare una placenta. Se inietto all'interno di questa blastocisti tetraploide (così come facevo nel topo chimerico) delle staminali embrionali, le staminali embrionali (diploidi) potranno mescolarsi a questa massa cellulare interna tetraploide. Se queste staminali embrionali sono veramente pluripotenti possono complementare l'incapacità della massa cellulare interna tetraploide di formare un embrione. Questo saggio si chiama complementazione di una blastocisti tetraploide proprio perché le cellule che inietto superiscono all'incapacità delle cellule $4n$ di formare l'embrione.

