

gli articoli scientifici gli artico

*Silvia Garagna, Carlo Alberto Redi e
Maurizio Zuccotti*

*Dal capello al laser:
la manipolazione delle cellule
staminali in biomedicina*

*Cellule staminali,
Trasferimento nucleare,
Clonazione, Terapia cellulare,
Forbici e pinze laser*



L'esperimento fantastico di Spemann...

Le grandi acquisizioni concettuali della embriologia sperimentale della fine del secolo XIX e degli inizi del secolo XX (tutte inserite nel solco della sperimentazione tesa a dimostrare la teoria del plasma germinale di August Weismann, la trasmissione ed espressione degli elementi ereditari) derivano da esperimenti effettuati con i pochi strumenti disponibili impiegati per agitare, tagliare, asportare, ablate, legare, incidere, suturare gli stadi iniziali dello sviluppo embrionale di alcuni organismi animali. Questi organismi modello erano di necessità specie animali nelle quali le uova e gli oociti possono essere facilmente manipolabili (oltre che facilmente reperibili ed allevabili) per le grandi dimensioni: ecco la scelta di rane, tritoni, ricci di mare e lumache di vario genere. Così, la grande abilità manuale permette ad eccezionali personalità scientifiche quali Wilhelm Roux (sviluppo a mosaico: ogni blastomero può originare una ed una sola parte dell'animale), Hans Driesch (sviluppo regolativo: la potenzialità prospettica di un blastomero, i tipi cellulari a cui può dare origine, è maggiore del proprio destino prospettico, i tipi cellulari a cui da origine nel corso del normale sviluppo embrionale) e Sven Horstadius (gradienti morfogenetici: la concentrazione di "sostanze" necessarie allo sviluppo diminuisce o aumenta dal polo animale a quello vegetativo) di compiere esperimenti cruciali per l'avanzamento delle conoscenze scientifiche. In retrospettiva, questi dati risulteranno utili al passaggio del dibattito scientifico sulla differenziazione cellulare dalla ipotesi provvisoria di Charles Darwin (la teoria della pangenesi: ogni cellula somatica contiene delle particelle, i pangeni, capaci di migrare a ritroso nelle cellule germinali e così trasmette-

re le caratteristiche di quella cellula) alla teoria di Weismann della continuità del plasma germinale da una generazione all'altra (mentre la linea somatica si diversifica ad ogni generazione) ed alla comprensione dei meccanismi cellulari della differenziazione cellulare che giungono a punte non molto lontane da quelle attuali, come ovvio più approfondite a livello molecolare. Spicca tra tutti i ricercatori l'allievo di Theodor Boveri e successore alla cattedra occupata da August Weismann, Hans Spemann (Nobel nel 1935) per la genialità nella formulazione del disegno sperimentale e nella capacità di interpretazione dei risultati. Spemann interviene su morule di salamandra per compiere delle legature, parziali o totali, allo stadio di 8 o di 16 cellule

per seguire il destino differenziativo delle 4/8 cellule di destra e delle 4/8 di sinistra (Fig.1). Per eseguire le legature impiega i capelli di suo figlio! Spiega che i capelli di bambino sono i migliori, perché più morbidi ed al contempo più resistenti! Da questa affermazione è facile dedurre che deve aver compiuto una analisi comparata dei diversi tipi di capelli. Anche la giovanissima assistente, Hilde Proescholdt Mangold (vedi figura 1 in Hamburger, 1984; geniale ricercatrice, unica a vedere considerato il proprio lavoro di tesi dottorale per la attribuzione di un premio Nobel, uno dei soli due Nobel assegnati per studi di embriologia; premio che non le fu assegnato solo per la drammatica e prematura scomparsa per un incidente domestico) impiega i capelli del figlio di Spemann. Non dispongono di molti altri strumenti gli embriologi speri-

*Il problema centrale
della biologia dello sviluppo
era ed è ancora oggi
la comprensione dei meccanismi che
iniziano e regolano
la attività genica differenziale*

mentali, qualche ago rovente per fini ablazioni di sole poche cellule in precisi territori della morula o della gastrula, qualche tampone intriso di coloranti vitali per colorare le cellule e seguirne le migrazioni, siringhe, colle e qualche ingegnoso accorgimento per separare e mettere a contatto blastomeri (grandi o piccoli) a diversi stadi di sviluppo. È con questo bagaglio tecnico, e con l'impiego delle grandi uova di anfibio, che Hans Spemann e Hilde Mangold divengono quei maestri di microchirurgia che ancora oggi ammiriamo. Ed è con queste premesse tecniche che vengono elaborati gli "strumenti concettuali" oggi a noi familiari della morfogenesi sperimentale e che riteniamo imprescindibili per la comprensione dei fenomeni del differenziamento cellulare e tissutale durante lo sviluppo di un nuovo individuo: induzione (primaria e secondaria), evocazione, competenza, gradienti e campi morfogenetici, informazione da posizione e, concetto gerarchicamente superiore, totipotenza nucleare delle fasi più precoci dello sviluppo embrionale (i nuclei delle cellule degli stadi iniziali sono equivalenti e totipotenti).

È questo il concetto chiave elaborato nella età d'oro della embriologia e della morfologia causale, ripreso nella metà del secolo scorso con la embriologia molecolare ed ancora tanto attuale oggi nelle ricerche di biologia e genetica dello sviluppo. Nel corso dello sviluppo, le cellule differenziandosi strutturalmente e funzionalmente acquisiscono specifiche caratteristiche morfologiche, biochimiche e fisiologiche tipiche della specializzazione tissutale finale.

Lo stato differenziato è caratterizzato da una attività genica differenziale che conferisce particolari proprietà biologiche a quel tipo cellulare ed è il risultato della attività di differenti combinazioni geniche che portano alla espressione di specifici complementi proteici (solo in alcuni e pochi organismi, nematodi, crostacei e ditteri, la differenziazione cellulare somatica è acquisita attraverso la eliminazione di porzioni di genoma o, ancora in casi eccezionali, attraverso la amplificazione genica; ma questi sono casi rari, non rappresentano il modello universale).

Il problema centrale della biologia dello sviluppo era ed è ancora oggi la comprensione dei meccanismi che iniziano e regolano la attività genica differenziale, il differenziamento cellulare. Già Spemann ha chiaro che questa è la domanda dell'Embriologia ed ipotizza di poter compiere un espe-

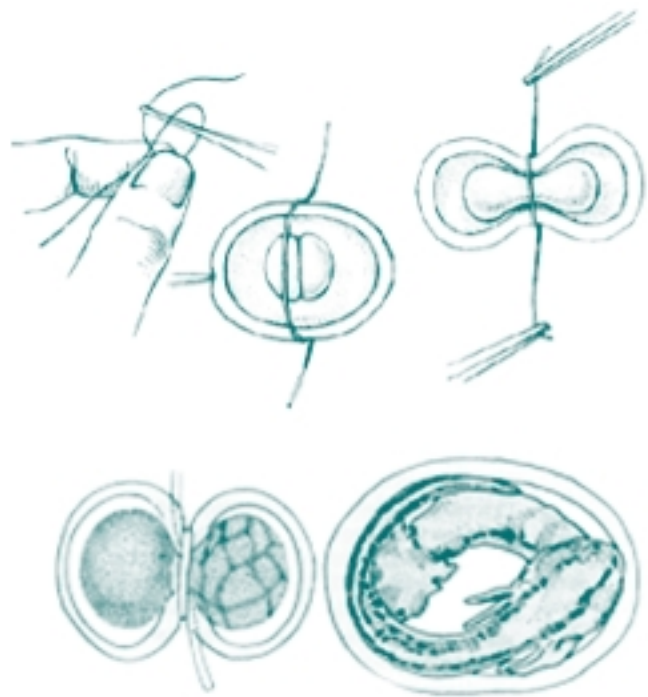


Figura 1: Origine artificiale di due gemelli di tritone ottenuti grazie alla strozzatura di un uovo. La legatura iniziale lascia il nucleo dello zigote nella metà destra, che inizia a segmentare. Il passaggio di un nucleo di blastomero nella parte sinistra, ancora indivisa, determina la ripresa della segmentazione anche in quella parte con la formazione di due gemelli.

perimento fantastico (11): trasferire nuclei di cellule somatiche prelevati nel corso del loro differenziamento per capire se e quando va persa la totipotenza, se ancora le cellule somatiche terminalmente differenziate hanno capacità di potersi riprogrammare, una volta inserite nell'ovocita enucleato a contatto del citoplasma. Il momento non è dei più propizi per realizzare l'esperimento, non disponendo degli strumenti tecnicamente adatti alla sua riuscita; resterà questo l'ultimo contributo, teorico, del grande Maestro che muore nel 1941.

Purtroppo, la proposta dell'esperimento fantastico in pieno periodo nazista porterà a malintesi sulla figura di Spemann, erroneamente presentato come scienziato nazista.

Una breve disamina storica (3) degli avanzamenti nelle conoscenze scientifiche, seguita in parallelo alle innovazioni tecnologiche degli strumenti impiegati, permette di meglio comprendere le attuali potenzialità della ricerca di base sulla biologia del differenziamento cellulare e le possibili trasposizioni dei risultati ottenuti in pratiche terapeutiche e di produzione industriale.

gli articoli scientifici gli artico

... la clonazione

La possibilità tecnica di ottenere dei micromovimenti (impiegando viti micrometriche per ottenere movimenti lineari discreti di stantuffi di siringhe) di sottili aghi che possono muoversi nelle tre direzioni spaziali (perché la siringa che li porta è articolata a cremagliera su due supporti, destro e sinistro) mentre al loro interno vengono esercitate pressioni idrauliche positive (per iniettare) e negative (per aspirare) permette a Robert Briggs e Thomas King di studiare la potenzialità nucleare nel corso del differenziamento cellulare che accompagna lo sviluppo in *Rana pipiens*. Di fatto, per svolgere queste ricerche, vengono perfezionate le tecniche necessarie ad enucleare gli oociti (anche con l'impiego di radiazioni UV) ed a preparare i nuclei isolati da trasferire negli stessi. È così che Briggs e King nel 1952 mettono in luce una progressiva limitazione della totipotenza nucleare: nuclei di blastula sono in grado, una volta trasferiti negli oociti enucleati, di riprogrammarsi e controllare lo sviluppo di un girino, nuclei di stadi di

sviluppo più avanzati (gastrula, neurula ed oltre) non danno luogo ad un normale sviluppo. Tutto ciò si verifica se si impiegano nuclei di cellule somatiche, i nuclei delle cellule germinali anche in stadi avanzati mantengono la capacità di controllare il normale sviluppo. Un ulteriore perfezionamento strumentale (in particolare delle micropipette) permette a John Gurdon, che impiega rospi sudafricani *Xenopus laevis*, di suggerire nel 1966 una perdita di totipotenza meno severa di quanto si potesse ritenere e di ottenere lo sviluppo di un embrione di *Xenopus* fino al completamento dello stadio larvale.

Gurdon dimostra così che i nuclei di cellule somatiche differenziate, trasferiti a contatto del citoplasma di una cellula uovo enucleata, sono in grado di modificare il proprio programma genetico fino ad assumerne uno nuovo, di tipo embrionale e quindi sono capaci di iniziare e proseguire lo sviluppo larvale. Sul finire del 1970 quindi il fantastico esperimento proposto da Spemann ha avuto luogo, sebbene nessun embriologo fosse ancora in grado di ottenere un individuo adulto dal trasferimento di nuclei somatici diffe-

L'impiego delle cellule staminali è una delle aree più promettenti per la ricerca e lo sfruttamento commerciale da parte delle imprese di biotecnologia. Le maggiori imprese coinvolte e loro aree di ricerca.

IMPRESA	PAESE	DIPENDENTI	CELLULE STAMINALI
AASTROM BIOSCIENCES	Ann Harbor, MI, USA	33	ematopoietiche
GERON CORPORATION	Menlo Park, CA, USA	100	embrionali - fetali
LAYTON BIOSCIENCES	Atherton, CA, USA	25	neuronal fetali
NEURALSTEM BIOPHARM	Bethesda, MD, USA	14	neuronal fetali
NEURONYX INC.	Malvern, PA, USA	10	neuronal
NEXELL THERAPEUTICS INC	Irvine, CA, USA	120	ematopoietiche
OSIRIS THERAPEUTICS	Baltimore, MD, USA	75	mesenchimali
RENEURON	London, UK	17	neuronal
STEM CELL SCIENCES	Melbourne, Australia	-	embrionali
STEMCELLS INC	Sunnyvale, CA, USA	16	neuronal da adulto



Figura 2 - Stazione di lavoro per microchirurgia cellulare laser CELL ROBOTICS (cortesia della Olympus Italia). I due fasci laser sono convogliati al preparato istologico o cellulare portato da un microscopio rovesciato. Le operazioni di "pinza" e "bisturi" sono compiute con leve di comando (joysticks) e seguite su monitor.

renziati prelevati da individui adulti.

Nel 1981, Illmensee e Hoppe sostengono di aver prodotto dei topolini grazie al trasferimento di nuclei di cellule embrionali allo stadio di blastocisti in oociti enucleati (e la rivista *Cell* dedica la copertina all'evento). Nessun altro ricercatore riesce però a ripetere l'esperimento e la comunità scientifica giudica una frode il lavoro. A posteriori, più che il primo grande caso di frode scientifica, il successo del lavoro di Illmensee e Hoppe costituisce una chiara prova della rilevanza della capacità manuale del ricercatore nel micromanipolare gameti ed embrioni per l'esito dell'esperimento in embriologia sperimentale. Nel 1986 e nel 1987, Steve Willadsen ed il gruppo di Neil First clonano delle pecore e dei bovini trasferendo nuclei di embrioni preimpianto in oociti enucleati. Nel 1996, Campbell, Wilmut e collaboratori, ottengono il completo sviluppo di embrioni di pecora dal trasferimento di cellule embrionali staminali

(cellule ES), cresciute in coltura, in oociti enucleati.

Questa nuova tecnica assicura, grazie al passaggio attraverso la procedura di coltura delle cellule ES, la possibilità di clonare un numero illimitato di individui. Già un anno dopo lo stesso gruppo clona una pecora a partire da cellule isolate da un individuo adulto (12): cellule provenienti dalla disgregazione della ghiandola mammaria, mantenute per un periodo di due settimane in un terreno di coltura privo di alcuni fattori di nutrizione per rallentarne la divisione cellulare e bloccarle in G₀, vengono trasfettate con il virus Sendai che legandosi alla membrana plasmatica ne facilita la fusione con l'oocita (successivamente al trasferimento di quest'ultima nello spazio perivitellino dell'oocita stesso). Nell'esperimento del gruppo scozzese furono trasferite 277 cellule somatiche in altrettanti oociti.

Di questi oociti, 29 (10,5 %) si svilupparono fino allo stadio di morula/blastocisti e vennero trasferiti nell'utero di

13 femmine.

Di queste 29 blastocisti, 1 completò lo sviluppo fino alla nascita di un agnello, chiamato Dolly. Anche se la procedura adottata dal gruppo scozzese non si è dimostrata facilmente utilizzabile, questo esperimento rappresenta un passaggio importantissimo nella storia dell'embriologia e, finalmente, a ottanta anni dagli esperimenti di Spemann ci è dato di sapere che il genoma di una cellula somatica di mammifero adulto può essere riprogrammato, grazie al contatto con il citoplasma di un oocita enucleato, e successivamente portare alla nascita di un nuovo individuo.

Nel 1998, il gruppo diretto da Ryuzo Yanagimachi (Premio Internazionale per la Biologia. 1996) ottiene la nascita di alcuni topolini da zigoti prodotti grazie al trasferimento di nuclei somatici in oociti enucleati (13).

Un punto critico dell'esperimento di Wilmut e collaboratori riguardava l'impossibilità di conoscere il fenotipo della cellula somatica utilizzata per il trasferimento nucleare: il gruppo diretto da Yanagimachi impiega cellule follicolari del cumulo ooforo (in fase G0 del ciclo cellulare) estraendone il nucleo e trasferendolo direttamente nell'oocita enucleato (diversamente dal gruppo di Wilmut).

L'esperimento di Yanagimachi stabilisce con chiarezza che il programma genetico di un nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate può essere riprogrammato (grazie al contatto con il citoplasma di una cellula uovo enucleata) così da acquisire di nuovo la capacità di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale sino alla nascita di un nuovo individuo: dal punto di vista genetico, il nuovo individuo è una "copia genomica" del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare, è un clone.

La resa percentuale di cloni è di circa 1 su 84 con la tecnica di Yanagimachi e di 1 su 277 con quella di Wilmut.

Dal capello al laser: microchirurgia cellulare

Ancora, quasi dopo un secolo, è l'approccio sperimentale quello che si dimostra più fruttuoso per le acquisizioni concettuali sulla composizione e funzione del genoma (storicamente, la sintesi operata dalla functional genomics non è concepibile al di fuori di questo quadro tecnico): la abilità e la capacità tecnica di enucleare e trasferire nuclei permette infatti il disegno di esperimenti fantastici (sensu Spemann) il cui razionale sia molto riduzionista, in grado di fornire al ricercatore una ed una sola risposta.

È ragionevole ritenere che l'impiego di nuove strumentazioni e tecnologie utili alla microchirurgia cellulare non

invasiva possa contribuire in modo determinante ad un ulteriore avanzamento delle capacità di micromanipolazione cellulare, così da permettere il trasferimento dei dati scientifici ottenuti dalla ricerca di base in protocolli di applicazioni industriali e terapeutiche, anche nell'immediato futuro (14). Le nuove strumentazioni, a partire dallo stupefacente uso fatto da Spemann dei capelli, sono oggi quelle che

si basano sull'impiego di alcune proprietà della luce per sviluppare forbici e pinze laser capaci di manipolare cellule, ed alcune loro componenti, al fine di compiere delicate microdissezioni.

A partire dagli anni intorno al 1970, Michael Berns e Donald Rounds svilupparono forbici laser mentre poco dopo il 1980 Arthur Ashkin scoprì che un laser di bassa potenza (1 watt o meno), ad impulso continuo (nell'intorno di 980 nm di lunghezza d'onda) permetteva di bloccare e muovere cellule od organuli cellulari, agendo così da pinza (10). Come ben visibile dalla Figura 2, una stazione di lavoro per chirurgia laser della cellula ha oggi le dimensioni di un normale microscopio invertito collegato ad un monitor ed a due moduli laser di dimensioni estremamente ridotte.

Ciò è possibile per le notevoli sofisticazioni raggiunte nella

*A ottanta anni
dagli esperimenti di Spemann
ci è dato di sapere che
il genoma di una cellula somatica
di mammifero adulto
può essere riprogrammato,
grazie al contatto con il citoplasma
di un oocita enucleato*

tecnologia di produzione dei laser, capace di coniugare miniaturizzazione ad alta intensità del fascio laser.

I principi fisici che determinano la funzione di forbice (o scalpello ottico o bisturi) sono essenzialmente legati alla cessione di energia alla struttura biologica, mentre la funzione di pinza è legata alla conservazione della quantità di moto che si verifica quando una coppia di raggi simmetrici di un fascio laser viene rifratta da una struttura biologica (1): in questo caso, la diffusione della luce causata dall'oggetto genera un cambiamento nel momento dei fotoni rifratti.

A causa della conservazione della quantità di moto, i fotoni rifratti generano un momento di eguale magnitudine (e in direzione opposta) capace di generare una forza che agisce sull'oggetto rifrangente.

Questa è la forza della luce laser, che può essere sfruttata per bloccare o muovere oggetti in base all'impiego delle componenti assiale e radiale della forza stessa (Fig.3).

Le forbici impiegano generalmente laser ad una lunghezza d'onda di circa 390 nm (anche se sono disponibili laser a lunghezza d'onda sino ai 700 nm, è preferita di norma la emissione a 390 nm poiché non ha sovrapposizione con lo spettro di assorbimento del DNA o delle proteine ed è ben trasmessa dalle ottiche dei microscopi), ideali per il taglio di cellule ed organuli cellulari con una risoluzione submicrometrica: così possono essere eseguite fini ablazioni cellulari, per fotodistruzione; creati piccoli fori nella membrana cellulare; tagliati i neuriti dei neuroni in crescita o piccole parti di cromosomi; dissezionata la zona pellucida; facilitata la fusione di cellule e molte altre operazioni.

Le pinze laser impiegano emissioni nell'intorno 980 - 1100 nm.

Grazie all'impiego di questo tipo di strumentazione (le cui capacità operative vanno ben oltre quelle dei pur sofisticati micromanipolatori meccanici di cui oggi disponiamo) è evidente che si possono disegnare esperimenti di trasferimento di nuclei in cui l'invasività della operazione di enucleazione, prelievo dei nuclei e trasferimento sia pressoché nulla.

Anche il prelievo di intere cellule può essere eseguito in modi non traumatici, sotto il profilo della meccanica della operazione (9).

Clonazione terapeutica e cellule staminali

Queste opportunità tecniche aprono un promettente campo di ricerca sulla riprogrammazione della capacità di sviluppo (pluripotenza) dei nuclei somatici e sul prelievo delle cellule staminali dai distretti tissutali differenziati in cui si trovano. Queste ricerche già lasciano intravedere una moltitudine di applicazioni terapeutiche a partire dallo sviluppo di protocolli basati sull'impiego di cellule staminali e di nuclei riprogrammati per la produzione dei necessari reagenti biologici (cellule e tessuti ricavati dalla espansione in coltura). È così che la produzione di tipi cellulari specifici potrebbe permettere di trattare molte malattie (2): diversi tipi di neuroni per l'Alzheimer ed il Parkinson, cellule muscolari cardiache per le vittime di infarto, cellule pancreatiche secernenti insulina per alcuni tipi di diabete sino alla generazione di papille dermali o cellule staminali del follicolo pilifero per alcuni tipi di calvizie. Per capire la dimensione delle possibilità di intervento terapeutico, basti pensare che solo negli USA circa 60 milioni di persone presentano patologie del sistema cardiovascolare, più di 15 sono affette da diabete, 10 dalla osteoporosi, più di 4 dall'Alzheimer e più di 2 dal Parkinson (8). Una Europa sempre più longeva e con un tasso demografico inferiore a quello di sostituzione è una Europa destinata ad essere costituita in grande maggioranza da senescenti bisognosi delle terapie basate sull'impiego delle cellule staminali (6). L'ottenere un organo è da considerarsi ancora lontano: le cellule in differenziamento giungono a formare un organo anche grazie a messaggi di tipo posizionale, moltiplicandosi e crescendo su supporti specifici, supporti che oggi non riusciamo a riprodurre in vitro nonostante i progressi della bioingegneria dei materiali biologici. Ad oggi, la riprogrammazione terapeutica delle funzioni del genoma di cellule somatiche da adulto può essere ottenuta seguendo una delle tre vie indicate in Figura 4.

Ciascuna delle tre tecniche di riprogrammazione ha lo scopo di produrre popolazioni cellulari utilizzabili per trapianti, o tessuti differenziati ad hoc, e rappresenta una realistica possibilità per l'immediato futuro. Nella via più lunga, diversi tipi cellulari sono ottenuti dalla differenziazione di cellule staminali derivate da quelle del nodo

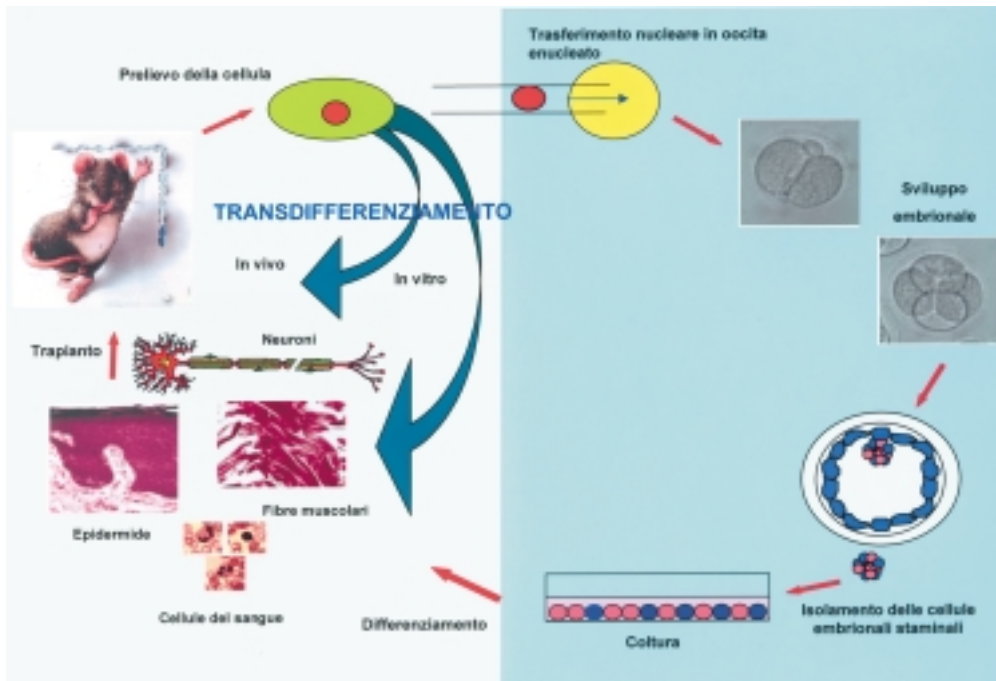


Figura 3.

Diversi tipi cellulari possono essere prodotti per il trattamento di patologie differenziando in vitro cellule staminali ottenute sia dalla riprogrammazione di nuclei somatici trasferiti in oociti (con problemi di ordine etico) sia per isolamento diretto dalla biopsia.

È possibile anche la transdifferenziazione delle staminali (in vivo) contenute nella biopsia per reimpianto diretto della biopsia stessa in un diverso tessuto somatico.

embrionale della blastocisti preimpianto e poi coltivate e mantenute indifferenziate. L'impiego di questi tipi cellulari non è esente da problemi di tipo etico a causa della generazione di embrioni per l'ottenimento di cellule ES. È stato tentato l'impiego di cellule uovo di altre specie, ma i risultati ottenuti dimostrano che non è possibile ottenere un normale sviluppo embrionale (5).

Una alternativa può essere l'impiego di cellule staminali del paziente stesso oppure l'utilizzo di cellule del cordone ombelicale del paziente (questo tessuto è ricco di cellule staminali) congelate alla nascita.

Questa via è fortemente condizionata dallo sviluppo delle strumentazioni e delle metodologie necessarie al riconoscimento ed al prelievo delle cellule staminali dalle biopsie di tessuto adulto. Problema questo valido anche per la terza via, quella del prelievo di staminali da un distretto tissutale e loro impianto in altro tessuto. In quest'ultimo caso, la transdifferenziazione è ottenuta in vivo, mentre nella seconda via è raggiunta grazie a particolari situazioni di coltura cellulare, in vitro. Risulta chiaro come prioritario sia il proseguimento della ricerca di base dei meccanismi cellulari e molecolari sottesi ai fenomeni di de- e ri-programmazione del genoma, in particolare sull'impiego di modelli animali per la riprogrammazione del genoma somatico in vitro in assenza del citoplasma del gamete femminile e la individuazione, raccolta e transdifferenziazione delle staminali dell'adulto.

Staminali e business

Già diverse imprese mecatili sono attive a questo riguardo. La tabella 1 riporta alcune di queste attività con lo scopo della produzione industriale. È chiaro l'intento di giungere alla produzione di significative quantità di reagente biologico sfruttando in particolare la possibilità di transdifferenziare (grazie all'impiego di particolari miscele di sostanze quali l'acido retinoico, l'insulina, triiodotironina, eritropoietina ed altre; è questo un campo di attivissima ricerca) le cellule staminali comunque ottenute, poiché la transdifferenziazione amplia di diversi ordini di grandezza la potenzialità produttiva dei diversi tipi istologici. Ciascuna di queste imprese è chiaramente indirizzata allo sfruttamento commerciale delle capacità proliferative e differenziative delle cellule staminali, con specifiche strategie sia di produzione (staminali da embrione, da feto o da adulto) sia di settore applicativo (identificabile in prima istanza con l'origine delle staminali: cellule del sistema nervoso, del mesenchima, del sangue).

Il settore più "tradizionale" è quello delle staminali ematopoietiche, ma con il progredire delle tecniche di prelievo, transdifferenziazione ed espansione in coltura i settori verranno sempre più ad identificarsi. Così, la Osiris Therapeutics, occupandosi di staminali del mesenchima, mira alla produzione di diversi tipi cellulari - osteoblasti, condrociti, mioblasti, preadipociti ed altri ancora - che si

i scientifici gli articoli scienti

differenziano dal mesenchima. Le potenziali applicazioni cliniche sono quelle legate alla terapia cellulare per la rigenerazione ed il recupero funzionale dell'osso, della cartilagine e del muscolo. È chiaro che patologie (ereditarie o traumatiche) quali la osteoporosi, la osteoartrite, l'infarto, l'obesità, traumi di ossa e tendini trovano un ulteriore scenario di trattamento. Attività principale della Neurotech è la identificazione ed il prelievo di staminali neuronali dal cervello di adulti umani per la loro espansione in coltura (ottenibile con l'aggiunta di Epidermal Growth Factor, basic Fibroblast Growth Factor e Leukaemia Inhibitory Factor al terreno di coltura) e trapianto allo stadio di neurosfere in ospiti murini per saggiarne la funzionalità prima dell'impiego su pazienti. Emerge chiaro da questi due esempi l'apporto delle imprese BioTec alla ricerca di base. Di necessità, per una efficace competizione commerciale con le altre imprese, ciascuna di esse è tesa all'avanzamento delle conoscenze di base sul differenziamento (e, seppure oggi ancora limitatamente, alla creazione di nuovi posti di lavoro)

poiché l'identificazione dei fattori che più efficacemente stimolano la riprogrammazione è in grado di determinare il successo commerciale della impresa. È ragionevole attendersi un avanzamento rapido delle conoscenze dei fattori che specificano funzionalmente le cellule staminali e che compaiono nel corso della riprogrammazione del nucleo somatico (4,7), ad oggi scarsamente conosciuti; tra i pochi noti, l'espressione della fosfatasi alcalina, del fattore di crescita GDF-3, di trascrizione OCT-4, di repressione Genesis, la comparsa delle proteine del gruppo Polycomb e di quelle capaci di legare le isole CpG metilate. Spemann (11) ebbe a dire che “noi stiamo in piedi e camminiamo usando parti del corpo che si sarebbero potute utilizzare per pensare se si fossero sviluppate in altre parti dell'embrione” con ciò avendo chiara la alta flessibilità differenziativa del genoma e la reversibilità del programma genetico della cellula differenziata; invitava inoltre alla pazienza nel vedere realizzate le intuizioni: “quando il progresso è così rapido come lo è oggi in questo campo della scienza, non è così difficile

celbio

gli articoli scientifici gli artico

attendere pazientemente sino a che, passo dopo passo, una solida base di conoscenze è guadagnata". Se le attuali conoscenze di genomica funzionale e la disponibilità di micro-manipolatori cellulari laser permettono la riprogrammazione del genoma di cellule somatiche da adulti per la clonazione terapeutica, è già realizzata l'affermazione fatta dal grande Maestro quando disponeva di soli capelli!

Silvia Garagna¹, Carlo Alberto Redi¹ e Maurizio Zuccotti²

*¹Dipartimento di Biologia Animale, Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia,
e.mail: redi@unipv.it*

e.mail: garagna@unipv.it

*²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Parma
e.mail: zuccotti@unipr.it*

11. Spemann H. Embryonic Development and Induction. (Yale University Press, New Haven; 1938).

12. Willmut I, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997; 385:810-3.

13. Wakayama T, et al. R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 1998; 394:369-74.

14. Weissman I. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 2000; 287:1442-6.

Bibliografia

1. Berns M. Forbici e pinze laser. In: Svelto O (ed). Laser, Quaderni Le Scienze 1999, pp 44-9.

2. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. Cell 2000; 100:143-55.

3. Garagna S, Redi CA, Zuccotti M. Clonazione: storia e tecniche. Le Scienze 2000; 377:46-55.

4. Kikyo N, Wolffe AP. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. J Cell Science 2000; 113:11-20.

5. Lanza et al., 1999.

6. Lenoir N. Europe confronts the embryonic stem cell research challenge. Science 2000; 287:1425-6.

7. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. J Cell Science 2000; 113:5-10.

8. Perry D. Patients, voices: the powerful sound in the stem cell debate. Science 2000; 287:1423.

9. Simone N, et al. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. TIG 1998; 14:272-6.

10. Sheetz M (Ed). Methods in Cell Biology Vol.55: Laser Tweezers in Cell Biology. (Academic Press, San Diego, London; 1998).