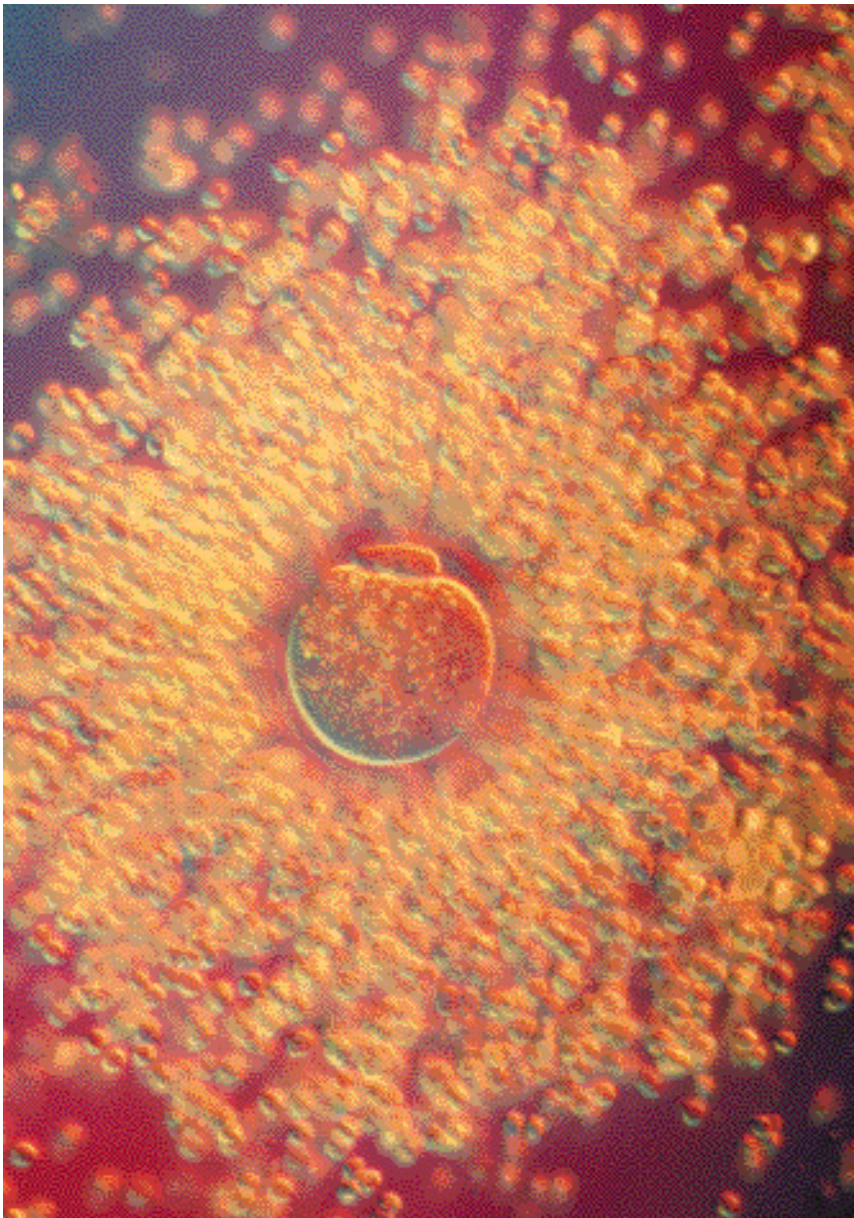


Clonazione: storia e tecniche

di Silvia Garagna, Carlo Alberto Redi e Maurizio Zuccotti

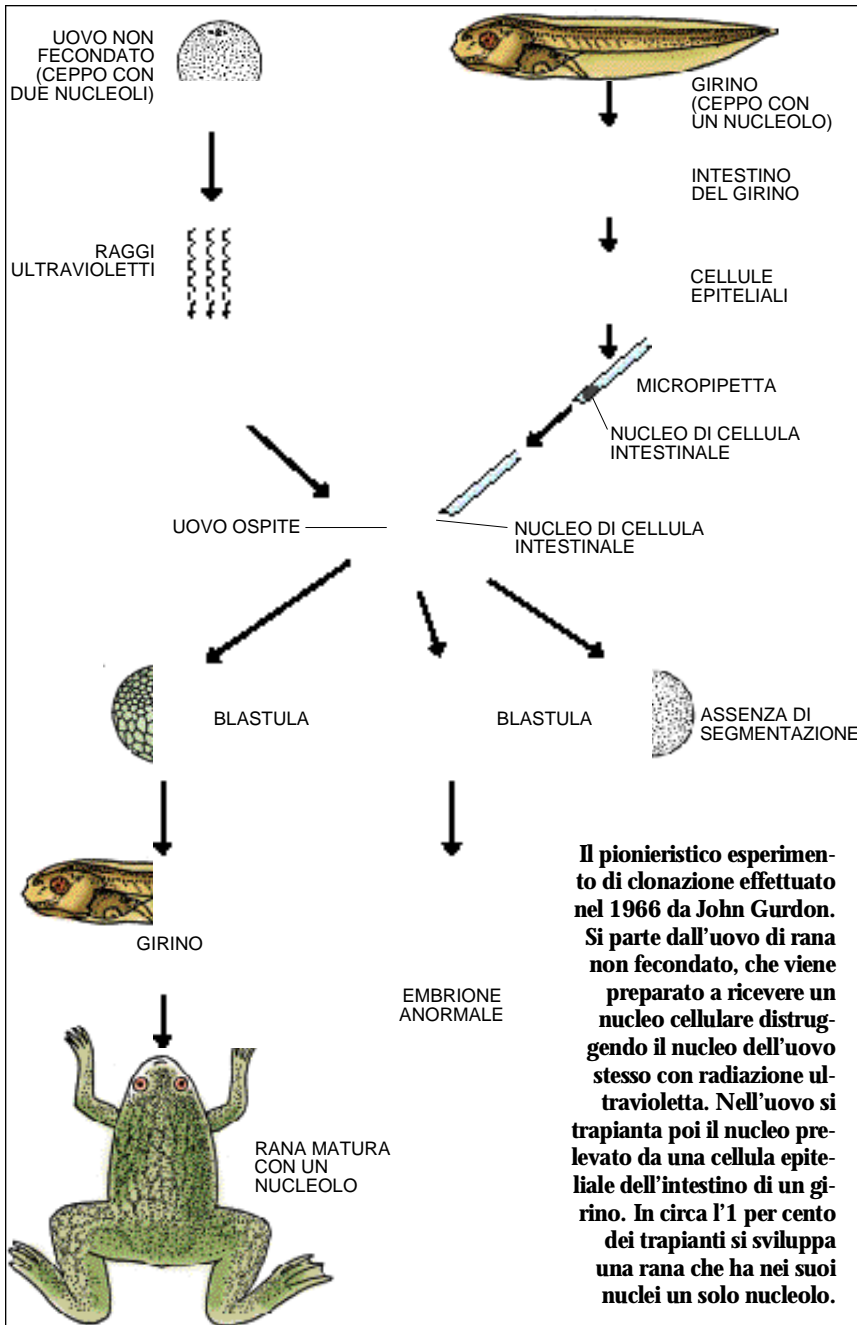
*Dai primi, faticosi
esperimenti sugli
anfibi ai clamorosi
risultati ottenuti sui
mammiferi,
attraverso
i continui progressi
teorici e pratici
dell'embriologia
e della biologia
cellulare*



La capacità tecnica di manipolare spermatozoi, oociti e cellule dei primi stadi embrionali nei mammiferi è giunta in anni recenti ad aprire tali e tante prospettive applicative nell'ambito della biologia della riproduzione animale e umana da suscitare domande e perplessità sulle conseguenze del loro impiego. Le principali riguardano i risvolti bioetici delle tecniche di clonazione e gli effetti che potranno avere sulla biodiversità se la fecondazione artificiale con pochi riproduttori diverrà l'unica modalità di riproduzione impiegata per gli animali di interesse economico. Si scontrano su questo terreno le due vocazioni della ricerca scientifica: quella applicata e quella di base. Ciò che abbiamo appena ricordato cade infatti nella sfera delle applicazioni di tipo commerciale di ricerche che hanno sì contribuito enormemente all'avanzamento delle conoscenze scientifiche di base, ma che ancora necessitano di tanto tempo e molti investimenti per giungere a fornirci un'idea più chiara di fenomeni biologici che comunque siamo già in grado sfruttare economicamente.

A più di 200 anni dalla prima fecondazione artificiale eseguita nel 1781 da Lazzaro Spallanzani resta ancora moltissimo da scoprire sugli eventi che regolano le primissime fasi dello sviluppo embrionale. La fecondazione ha inizio con la fusione tra la cellula germinale femminile (cellula uovo) e quella maschile (spermatozoo) a formare lo zigote. Lo zigote è la prima cellula del nuovo individuo che inizia a dividersi in due cellule, poi quattro, otto, sedici, trentadue e

Cortesia Yanagimachi Ryuzo



Il pionieristico esperimento di clonazione effettuato nel 1966 da John Gurdon. Si parte dall'uovo di rana non fecondato, che viene preparato a ricevere un nucleo cellulare distruggendo il nucleo dell'uovo stesso con radiazione ultravioletta. Nell'uovo si trapianta poi il nucleo prelevato da una cellula epiteliale dell'intestino di un girino. In circa l'1 per cento dei trapianti si sviluppa una rana che ha nei suoi nuclei un solo nucleolo.

così via fino al completo sviluppo del nuovo individuo. August Weissman (1834-1914) per primo postulò che durante la moltiplicazione cellulare le cellule somatiche si differenziano a formare i diversi organi e strutture che compongono l'intero corpo; viceversa le cellule germinali mantengono l'insieme dell'informazione ereditaria che verrà tramandata di generazione in generazione.

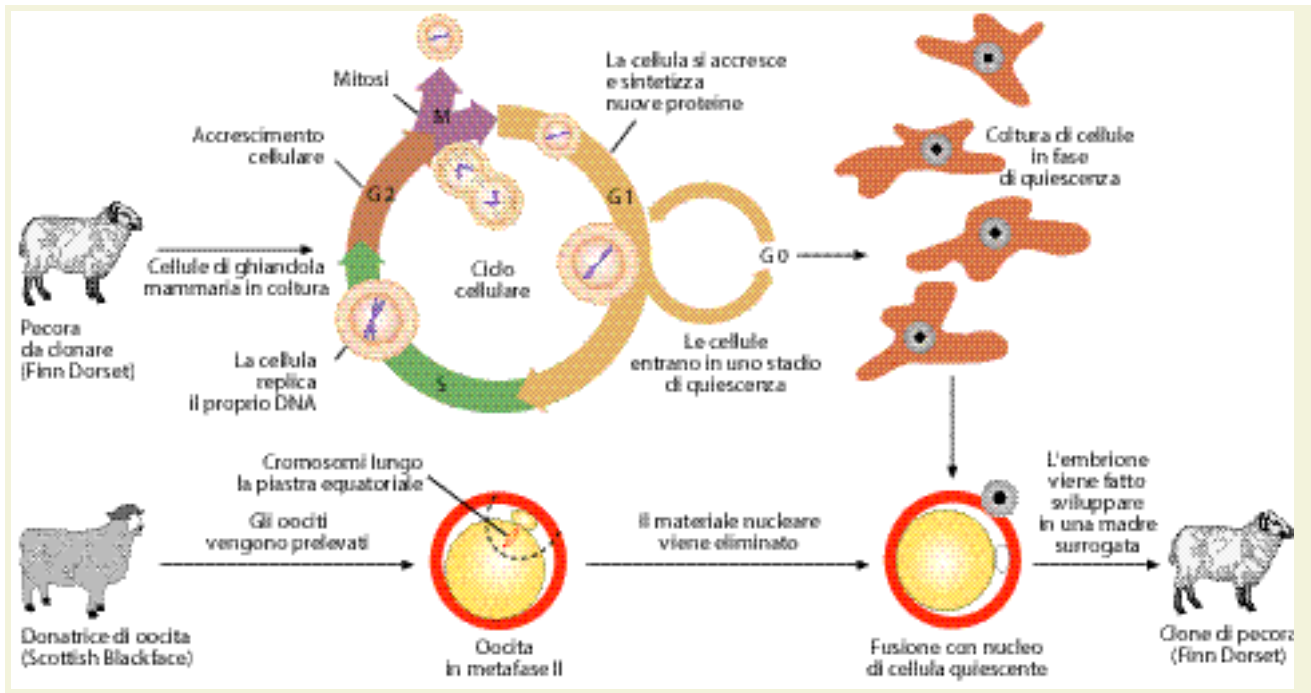
Studi successivi condotti da grandi embriologi quali Hans Driesch (1876-1941) e Hans Spemann (1869-1941) arrivarono a chiarire, nei modelli prediletti dalla biologia dello sviluppo (e cioè il riccio di mare, la rana e il tritone), i momenti, durante lo sviluppo embrionale, in cui la via differenziativa delle diverse linee di sviluppo assumeva le caratteristiche di «non ritorno». In particolare, Hans Spemann dimostrò con i suoi esperimenti che la determinazione è un processo progressivo che agisce durante lo sviluppo embrionale e porta le cellule dell'embrione a seguire una via differenziativa irreversibile da un certo stadio di sviluppo in poi. Egli intuì che i criteri per la differenziazione cellulare sono di tipo operativo, poiché nell'embrione iniziale non riscontrava una evidente differenziazione morfologica cellulare.

Rimaneva però aperto il quesito: «La differenziazione cellulare è un processo terminale oppure il programma genetico di una cellula differenziata può essere riprogrammato?». Per rispondere a quest'ultima domanda, Spemann propose nel 1938 quello che egli stesso definì «un fantastico esperimento». Sugerì di prelevare il nucleo da una cellula di un embrione in avanzata fase di sviluppo (oppure di un individuo adulto) e trasferirlo nel citoplasma di una cellula uovo enucleata, privata cioè del proprio nucleo, insieme con il corredo genetico. In altre parole, propose un esperimento di trasferimento nucleare per capire se il nucleo di una cellula differenziata fosse in grado di riprogrammare l'informazione espressa e di controllare lo sviluppo embrionale.

Purtroppo l'avanzamento delle conoscenze scientifiche necessita non solo di idee brillanti, ma anche di opportunità tecniche. Spemann non poté condurre l'esperimento per la mancanza di strumenti adatti alla manipolazione e alla dissezione delle cellule somatiche e germinali utili al trasferimento nucleare: sarebbero occorsi ancora 14 anni prima che gli embriologi riuscissero a cimentarsi con l'esperimento da lui proposto.

La microfotografia nella pagina a fronte mostra una cellula uovo di topo appena ovulata e circondata dalle cellule follicolari del cumulo. Qui a fianco, lo *Xenopus laevis* ottenuto da Gurdon; la rana è del tutto normale, il che dimostra che il nucleo della cellula intestinale ha un corredo completo di geni.

G. B. Gurdon, Università di Oxford



Da «Spektrum der Wissenschaft», aprile 1997

I primi trasferimenti di nucleo

Nel 1952 due ricercatori americani, Robert Briggs e Tom J. King, utilizzando una pipetta di vetro molto sottile, riuscirono a estrarre il nucleo da una cellula di embrione di rana allo stadio di blastula e lo trasferirono in una cellula uovo enucleata. L'embrione così ottenuto raggiunse lo stadio di girino, ma non fu in grado di svilupparsi fino allo stadio di adulto.

Il lavoro di Briggs e King, comunque, aveva per la prima volta posto le basi sperimentali (definendo gli strumenti e le tecniche necessarie per eseguire l'esperimento proposto da Spemann) per giungere a ottenere le due più importanti risposte che la comunità scientifica attendeva in quegli anni: primo, l'informazione genetica contenuta nel nucleo di una cellula differenziata è ancora presente nella sua totalità fisica? E se lo è, può essere di nuovo riprogrammata per lo sviluppo di un nuovo individuo? Secondo, le interazioni tra il citoplasma dell'ovocita e il nucleo trasferito sono in grado di dedifferenziare il nucleo introdotto e di dirigere poi lo sviluppo di un nuovo individuo?

Passarono quasi 15 anni perché si facessero ulteriori passi avanti: nel 1966 John Gurdon, dell'Università di Oxford in Inghilterra, pubblicò un lavoro straordinario in cui, utilizzando la metodologia di Briggs e King, dimostrava di avere ottenuto lo sviluppo di

un embrione, generato dal trasferimento del nucleo di una cellula differenziata prelevata dall'intestino di un girino di *Xenopus laevis* in un ovocita enucleato, fino al completamento dello stadio larvale. Gurdon aveva dimostrato che i nuclei di cellule somatiche differenziate, trasferiti nel citoplasma di una cellula uovo enucleata, sono in grado di modificare il loro programma genetico fino ad assumerne uno nuovo, di tipo embrionale, e quindi sono capaci di iniziare e proseguire lo sviluppo larvale. Così, sul finire degli anni sessanta, il «fantastico esperimento» proposto da Spemann aveva avuto luogo, sebbene nessun embriologo fosse stato ancora in grado di ottenere un individuo adulto dal trasferimento di nuclei somatici differenziati prelevati da girini oltre lo stadio differenziativo di girino in grado di alimentarsi, né tanto meno da individui adulti.

Nel 1981 un giovane ricercatore americano, Peter Hoppe, e un brillante ricercatore di origine tedesca, Karl Illmensee, pubblicarono un articolo in cui riferivano di avere ottenuto alcuni topolini in seguito al trasferimento di nuclei di cellule embrionali allo stadio di blastocisti in ovociti enucleati. Riuscendo a micromanipolare il gamete femminile e l'embrione preimpianto di un topolino, Hoppe e Illmensee avevano quindi dimostrato che era possibile clonare anche i mammiferi, la classe alla quale appartiene l'uomo.

Se l'esperimento di Hoppe e Illmensee aveva confermato la pluripotenzia-

lità dei nuclei di cellule embrionali, il passo successivo, la clonazione a partire da nuclei prelevati da cellule di individui adulti, avrebbe definitivamente dimostrato la reversibilità dei processi attivi nella determinazione del differenziamento cellulare. Purtroppo, nonostante i numerosi tentativi di ripetere l'esperimento di Illmensee e Hoppe, nessun ricercatore riuscì più a ottenere il completo sviluppo di un embrione di topo: nemmeno embriologi del calibro di James McGrath e Davor Solter, i quali tentarono di clonare topi a partire da nuclei prelevati da blastomeri di embrioni a 2, 4, 8 cellule sino alla blastocisti (stadio utilizzato da Hoppe e Illmensee) con risultati sempre negativi. Nel 1984, in un articolo pubblicato sulla rivista «Nature», essi dichiararono che «la clonazione di topi, utilizzando tecniche di trasferimento nucleare, è biologicamente impossibile».

Gli stessi Illmensee e Hoppe non furono più in grado di ripetere con successo i risultati riportati nell'articolo del 1981, e l'intero gruppo di ricerca, ormai screditato dal punto di vista accademico, si sciolse.

Le applicazioni zootecniche

L'impatto di questo fallimento sulla comunità scientifica fu tale che i finanziamenti ai laboratori di embriologia impegnati in ricerche di base sui fenomeni biologici che regolano lo sviluppo embrionale e la differenziazione cel-

Qui a destra, l'agnellino Dolly con la madre surrogata, una pecora di razza completamente diversa. La nascita di Dolly, comunicata sulla rivista inglese «Nature» del 27 febbraio 1997, suscitò immediatamente grande scalpore negli ambienti scientifici e non. Nella pagina a fronte è schematizzata la tecnica messa a punto dal gruppo di Ian Wilmut, al Roslin Institute di Edimburgo, per arrivare alla clonazione di Dolly. L'agnello da essi ottenuto derivava da un nucleo di cellula mammaria fornito da una pecora di razza Finn Dorset inserito in un oocita enucleato di una pecora Scottish Blackface. In realtà gli oociti che si svilupparono fino alla blastocisti e che vennero successivamente inseriti nell'utero di 13 madri surrogate furono 29, ma solo uno di essi riuscì a completare lo sviluppo fetale fino a divenire un agnello (per forza di cose femmina) perfettamente normale e fertile, come si dimostrò alcuni mesi più tardi.



lulare (e che per questi studi utilizzavano tecniche di trasferimento nucleare) vennero bloccati. In seguito, la clonazione di mammiferi perse di interesse per i biologi dello sviluppo, ma continuò nell'ambiente veterinario per l'interesse applicativo in ambito zootecnico. In quest'ambito infatti le potenziali ricadute economiche derivanti dall'opportunità di ottenere con successo animali (bovini, suini eccetera) identici agli individui donatori di un genoma (quindi del nucleo utilizzato nel trasferimento nucleare) ricco di tratti genetici di interesse commerciale risultarono immediatamente evidenti. Due erano i laboratori impegnati in questo tipo di ricerche: quello di Steen M. Willadsen in Gran Bretagna e quello di Neil First negli Stati Uniti. Nel 1986, Willadsen annunciava di avere clonato alcune pecore trasferendo nuclei di embrioni preimpianto in oociti enucleati. Pochi mesi dopo, nel 1987, Neil First pubblicava un articolo dimostrando di avere ottenuto nel suo laboratorio alcuni vitelli a partire da cellule embrionali preimpianto, e più tardi ottenne un nuovo successo a partire da cellule della blastocisti, ossia le stesse cellule del nodo embrionale utilizzate anni prima negli esperimenti di Illmensee e Hoppe sul topo. Impiegando tecniche di trasferimento nucleare, a partire dal 1986 a oggi, sono stati ottenuti migliaia di bovini, suini, e ovini.

Nel 1996, il gruppo diretto da Ian Wilmut, dell'Istituto Roslin di Edimburgo in Scozia, perfezionò ulteriormente la tecnica. Dalla disaggregazione

delle cellule del nodo embrionale di pecora otteneva circa 20 cellule che non venivano utilizzate come tali, ma bensì coltivate *in vitro* per alcuni giorni, così da ottenere una popolazione di migliaia di cellule identiche tra loro. Ciascuna di queste cellule era potenzialmente in grado di dare origine a un individuo clonato, identico alle altre migliaia di individui ottenibili a partire dalle cellule embrionali della stessa popolazione.

Nonostante che la clonazione di individui a partire da cellule embrionali non costituisse più una novità, almeno in ambiente zootecnico, nel febbraio del 1997 la notizia, apparsa sulla rivista «Nature» sempre a opera del gruppo di ricerca diretto da Ian Wilmut, della nascita di un agnello a partire da un oocita enucleato nel quale era stato trasferito il nucleo di una cellula somatica di pecora adulta colse di sorpresa la comunità scientifica internazionale. Esaminiamo da vicino l'esperimento di Wilmut. Cellule della ghiandola mammaria furono disagregate e mantenute, per un periodo di due settimane, in un terreno di coltura privo di alcuni nutrienti al fine di rallentare la divisione cellulare e bloccarle in una fase del ciclo cellulare detta G0. Le cellule furono poi incubate in un terreno contenente il virus Sendai, che legandosi alla membrana plasmatica della cellula somatica facilitava, successivamente al trasferimento di quest'ultima nello spazio perivitellino dell'oocita, la sua fusione con l'oocita.

Nell'esperimento del gruppo scozzese-

se furono trasferite 277 cellule somatiche in altrettanti oociti. Di questi oociti, 29 (ossia il 10,5 per cento) si svilupparono fino allo stadio di morula/blastocisti e vennero poi trasferiti nell'utero di 13 femmine. Di queste 29 blastocisti, solo una completò lo sviluppo fino alla nascita di un agnello, la famosissima Dolly.

Dall'analisi critica del lavoro del gruppo scozzese emerge un punto di estrema rilevanza concettuale: l'impossibilità di riconoscere tra le cellule disagregate della ghiandola mammaria quale abbia contribuito alla nascita di Dolly. In seguito alla disaggregazione delle ghiandole mammarie si ottengono diversi tipi cellulari isolati - cellule epiteliali, fibroblasti e linfociti - di cui è però molto difficile distinguere le caratteristiche morfologiche, ossia il fenotipo, dopo che sono state a lungo coltivate *in vitro*. Quindi, a oggi, non conosciamo quale sia la cellula somatica che ha permesso la nascita di Dolly.

Anche se la procedura adottata dal gruppo scozzese si è rivelata aperta a critiche, non vi è dubbio però sul fatto che questo esperimento rappresenti un passaggio importantissimo nella storia dell'embriologia e finalmente, a 80 anni dagli esperimenti di Spemann, siamo in grado di dare una risposta alle domande allora poste: il genoma di una cellula somatica di mammifero adulto può essere riprogrammato all'interno del citoplasma di un oocita enucleato ed è in grado di sostenere lo sviluppo embrionale a termine fino alla nascita di un nuovo individuo.

Il topo, modello animale ideale

La pecora purtroppo non rappresenta il modello animale ideale per gli studi di base che possono portare alla comprensione dei meccanismi e delle molecole coinvolte in questo processo di riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento all'interno dell'ovocita. Le conoscenze di biologia della riproduzione, di embriologia molecolare e, più in generale, di genetica di questo animale sono estremamente limitate. Al contrario, il topo rappresenta il modello sperimentale ideale perché è il mammifero, assieme all'uomo, di cui meglio conosciamo la genetica, la biologia della riproduzione e dello sviluppo. Il topolino rappresenta quindi il modello animale più prezioso per la ricerca biomedica.

Alla nascita di Dolly, i biologi dello sviluppo sono tornati a chiedersi quali siano i fattori che permettono a uno zigote ottenuto dal trasferimento nucleare di terminare lo sviluppo. Un aspetto importante che distingue lo sviluppo preimpianto della pecora da quello del topo riguarda le modalità e i tempi di attivazione dei geni embrionali. In tutti i mammiferi le prime fasi dello sviluppo embrionale a partire dallo zigote avvengono grazie agli RNA messaggeri (mRNA) e alle proteine di origine materna, quindi già presenti nel citoplasma dell'ovocita e prodotti durante l'oogenesi. Questi mRNA e queste proteine andranno esaurendosi col procedere dello sviluppo embrionale, e quindi l'embrione dovrà sintetizzarne di nuovi.

L'attivazione del genoma embrionale (ZGA, dall'inglese *zygotic genome activation*) avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle diverse specie di mammiferi. Nel topo la ZGA avviene a partire dall'embrione a 2 cellule, nell'embrione umano a partire da 4 cellule, nel coniglio e nella pecora a 16/32 cellule. L'embrione di pecora raggiunge lo stadio a 32 cellule 2,5 giorni dopo la fecondazione (o dopo il trasferimento del nucleo somatico), mentre il topo raggiunge lo stadio di 2 cellule 15-20 ore dopo la fecondazione. Ne consegue che l'embrione di pecora, rispetto a quello di topo, dispone di una maggior quantità di tempo per modificare il programma del genoma della cellula somatica. L'embrione di topo, ottenuto dopo il trasferimento di un nucleo somatico, deve avere il nuovo programma genetico adatto allo sviluppo



Foto di Mauro Fermantello

Studio del genoma di topo presso il Centro «Buzzati-Traverso» del CNR, a Montecitorio. Il topo è un animale modello ideale per tutti gli studi di biomedicina.

dell'embrione già pronto allo stadio di 2 cellule. Questa differenza era ritenuta da molti embriologi fondamentale nello spiegare gli insuccessi con il modello topo.

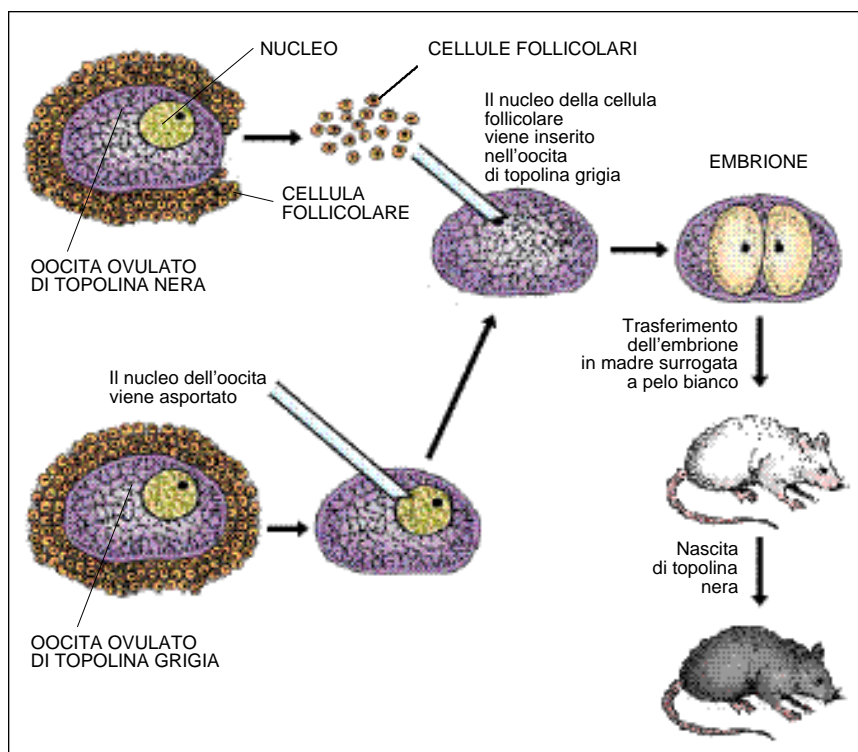
Finalmente un gruppo di ricerca diretto da Yanagimachi Ryuzo dell'Università delle Hawaii a Honolulu, e comprendente ricercatori giapponesi, statunitensi, inglesi e italiani (tra cui uno degli autori del presente articolo, Maurizio Zuccotti) riuscì a ottenere la nascita di alcuni topolini da embrioni prodotti grazie al trasferimento di nuclei somatici in oociti enucleati. Il relativo lavoro venne pubblicato su «Nature» nel luglio del 1998.

Come abbiamo ricordato in precedenza, un punto critico dell'esperienza di Wilmut e collaboratori riguardava l'impossibilità di conoscere il fenotipo della cellula somatica utilizzata per il trasferimento nucleare. Il

gruppo diretto da Yanagimachi ha utilizzato tre tipi cellulari di cui erano perfettamente noti l'origine e il fenotipo: le cellule follicolari del cumulo ooforo, le cellule del Sertoli e le cellule nervose. Tutti e tre questi tipi cellulari hanno cessato di moltiplicarsi e sono usciti dal ciclo cellulare; sono inoltre giunti al termine della differenziazione. Al momento dell'isolamento si trovano in quella che è conosciuta come fase G0 del ciclo cellulare. Le cellule follicolari sono le cellule che a centinaia circondano l'ovocita ovulato a formare una corona (il cumulo ooforo); le cellule del Sertoli rappresentano la componente somatica del tubulo seminifero e regolano l'andamento della spermatogenesi; infine, le cellule nervose utilizzate provengono dalla corteccia cerebrale di individui adulti. Mentre il gruppo di Ian Wilmut aveva scelto di trasferire la cellula somatica



Cortesia Yanagimachi Ryuzo



Lo schema qui a fianco mostra come è stata ottenuta Cumulina. Il nucleo di una cellula follicolare prelevata da una topolina a pelo nero viene trasferito nel citoplasma di una cellula uovo di topolina grigia. Lo pseudozigote così ottenuto è attivato in modo da proseguire lo sviluppo embrionale fino a blastocisti. La blastocisti è poi trasferita in una madre surrogata a pelo bianco che completerà la gravidanza. L'utilizzo di tre ceppi di topo con diversi colori del pelo (foto in alto) e marcatori genetici diversi (rappresentati dalle varie bande nella foto in basso) ha permesso di dimostrare con certezza che Cumulina, avendo il pelo nero, è nata dal nucleo della cellula follicolare donata dalla topolina nera.



intera nello spazio perivitellino dell'ocita e mediare la fusione tra le membrane plasmatiche con un virus, Yanagimachi e collaboratori hanno preferito estrarre il nucleo dalle cellule somatiche prescelte e trasferirlo direttamente all'interno del citoplasma dell'ocita. La procedura utilizzata per il trasferimento di nuclei di cellule follicolari è schematizzata nel disegno in questa pagina.

Nell'esperimento, l'immediata verifica del successo della clonazione avviene verificando il colore del pelo dei topolini. Sono stati infatti utilizzati tre ceppi di topolini caratterizzati dal diverso colore del pelo: un ceppo a pelo nero donatore delle cellule somatiche e quindi dei nuclei trasferiti, un ceppo a pelo grigio donatore delle cellule uovo e un terzo ceppo a pelo albino di femmine pseudogravide deputato a portare a termine la gravidanza dopo il tra-

sferimento degli embrioni allo stadio di blastocisti. La possibilità di indurre uno stato di pseudogravidanza nelle femmine di topo è molto utile ai ricercatori e si ottiene semplicemente facendo accoppiare una femmina di topo con un maschio sterile. La condizione ormonale che sostiene lo stato di gravidanza ha infatti inizio con l'accoppiamento, indipendentemente dalla presenza di spermatozoi e dalla avvenuta fecondazione delle cellule uovo. I ricercatori possono così trasferire nell'utero della femmina pseudogravida embrioni ottenuti *in vitro*, i quali potranno impiantarsi sulle pareti di un utero già pronto ad accoglierli.

Dei tre tipi cellulari impiegati - cellule follicolari, del Sertoli e cellule nervose - solo le cellule follicolari hanno dimostrato la capacità di sostenere lo sviluppo di embrioni normali e in grado di procedere attraverso tutte le tap-

pe dello sviluppo fetale sino alla nascita di nuovi individui. Raggiunto lo stadio di blastocisti, gli embrioni sono stati trasferiti nelle femmine pseudogravide albine. Al termine della gravidanza sono nati topolini il cui pelo, dopo circa 15 giorni, si è rivelato nero, così come ci si attendeva. Il primo topolino femmina così generato, chiamato Cumulina per la sua derivazione da una cellula del cumulo ooforo, è stato ottenuto con la tecnica ora esposta e chiamata «tecnica di Honolulu». In seguito, Cumulina è stata accoppiata con un maschio fertile e dopo 19 giorni di gravidanza ha partorito alcuni piccoli.

La maggior parte degli embrioni ottenuti con il trasferimento di nuclei di cellule del Sertoli si è impiantata sulla parete dell'utero, ma non ha proseguito lo sviluppo embrionale, e solo in un caso un embrione si è sviluppato fino

allo stadio di 8-9 giorni. I risultati peggiori in termini di sviluppo embrionale sono stati ottenuti con i nuclei delle cellule nervose, i cui embrioni non si sono mai sviluppati oltre lo stadio di blastocisti e solo in rari casi si sono impiantati nell'utero delle femmine pseudogravide.

Il colore del pelo non è stato l'unico marcatore genetico impiegato per provare che i topolini nati con la tecnica di Honolulu erano cloni. Sono stati utilizzati anche altri marcatori genetici tipizzando il DNA dei tre ceppi di topolini impiegati.

L'esperimento condotto da Yanagimachi e collaboratori con le cellule follicolari ha stabilito con chiarezza che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, può perdere il proprio programma genetico e acquisirne uno nuovo in grado di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale sino alla nascita di un nuovo individuo. Dal punto di vista genetico, il nuovo individuo è un clone del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare. Successivamente, con il trasferimento di nuclei di cellule follicolari, sono state ottenute diverse decine di topoline.

I meccanismi molecolari dello sviluppo embrionale

La ricostruzione storica degli esperimenti che hanno portato alla clonazione di anfibi prima e di mammiferi poi mostra quanto importante sia nel-

la scienza l'idea che porta a concepire un esperimento (Spemann aveva pensato alla clonazione nel 1938), ma quanto indispensabile sia anche lo sviluppo delle tecniche e degli strumenti necessari alla sperimentazione. È stato il miglioramento progressivo negli anni delle tecniche di micromanipolazione di gameti ed embrioni preimpianto che ha permesso sia il trasferimento nucleare da una cellula somatica alla cellula uovo enucleata con il minimo danno possibile, sia un aumento sempre maggiore del numero di embrioni manipolati così ottenuti.

La tecnica di trasferimento nucleare impiegata per l'ottenimento di Cumulina appare di estrema utilità per lo studio e la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano le prime fasi dello sviluppo dell'embrione di mammifero. È questo infatti un modello di studio che permetterà di capire come una cellula uovo sia in grado di riprogrammare il DNA di una cellula somatica ponendolo in grado di iniziare e completare lo sviluppo embrionale.

Fenomeni simili di azzeramento parziale o completo della «memoria» genetica di una cellula sono noti nel caso della crescita neoplastica, quando una cellula perde quelle che sono le proprie caratteristiche differenziative e, non riconoscendo più alcun segnale di inibizione, continua a proliferare con caratteristiche simili a quelle delle cellule dei primi stadi embrionali. La cellula uovo è straordinaria nelle sue capacità di riprogrammare il DNA del nucleo della cellula somati-

ca che è stata introdotta al suo interno. Essa è chiaramente in grado di guidare il DNA della cellula somatica verso un destino differenziativo che è quello caratteristico dello sviluppo embrionale.

La scoperta che anche nei mammiferi la differenziazione cellulare non è un processo terminale, ma può essere modificato, apre enormi possibilità sia nell'ambito della ricerca di base sia in quella biomedica e farmacologica. Quando avremo capito nei dettagli come sia possibile riprogrammare l'informazione genetica di una cellula somatica (e questo richiederà ancora molti anni di ricerca), disporremo di quelle conoscenze e di quegli strumenti concettuali che ci permetteranno di ripercorrere, passo per passo, gli eventi che portano alle trasformazioni tumorali e di individuare i meccanismi molecolari che li presiedono e li guidano. Potrebbe quindi diventare possibile un intervento terapeutico in grado di riprogrammare le cellule tumorali e farle «rientrare» nel sentiero differenziativo che avevano ormai perso.

La tecnica del trasferimento nucleare sviluppata dal gruppo di Yanagimachi offre ai biologi l'opportunità di impiegare un laboratorio di biologia cellulare e molecolare già confezionato dalla natura, l'oocita - o meglio il citoplasma dell'oocita - per svelare in termini di cinetica dello sviluppo quegli aspetti, e sono molti, ancora oscuri dell'interazione nucleo-citoplasma che presiedono alle espressioni del genoma nel vivente.

SILVIA GARAGNA è ricercatrice all'Università degli Studi di Pavia e ha l'incarico del corso di biologia dello sviluppo; ha lavorato presso le Università di Würzburg (Germania), York e Oxford (Inghilterra). Si occupa dello studio dei processi gametogenetici sia maschili sia femminili e delle prime fasi dello sviluppo in diversi modelli animali, in particolare nei mammiferi.

CARLO ALBERTO REDI è professore ordinario di zoologia all'Università di Pavia. Si è occupato di citochimica del DNA e della valutazione delle aneuploidie gametiche. Le sue ricerche attuali riguardano lo studio dello sviluppo e della differenziazione delle cellule germinali in diversi modelli animali e il loro impiego per saggi di ecotossicologia.

MAURIZIO ZUCCOTTI è professore associato di istologia ed embriologia presso la Facoltà di medicina dell'Università di Parma. Ha lavorato a lungo con il Laboratorio di biologia dello sviluppo dell'Università di Pavia e per sei anni ha lavorato in Università straniera, presso il laboratorio di Yanagimachi Ryuzo all'Università delle Hawaii e la Molecular Embryology Unit diretta da Marilyn Monk all'University College di Londra.

BRIGGS R. e KING T. J., *Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Trophoblasts: Studies on Polyploid* in «Journal of Embryology and Experimental Morphology», 27, pp. 447-465, 1952.

GURDON J. B., *Trapianti nucleari e differenziamento cellulare* in «Le Scienze» n. 13, settembre 1969 (esaurito).

GURDON J. B., LASKEY R. A. e REEVES O. R., *The Developmental Capacity of Nuclei Transplanted from Keratinized Skin Cells of Adult Frogs* in «Journal of Embryology and Experimental Morphology», 34, pp. 93-112, 1975.

ILLMENSEE K. e HOPPE P. C., *Nuclear Transplantation in Mus musculus: Developmental Potential of Nuclei from Preimplantation Embryos* in «Cell», 23, pp. 9-18, 1981.

WILMUT I. e altri, *Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells* in «Nature», 385, pp. 810-813, 1997.

WAKAYAMA T., PERRY A. C. F., ZUCCOTTI M., JOHNSON K. R. e YANAGIMACHI R., *Full-term Development of Mice from Enucleated Oocytes Injected with Cumulus Cell Nuclei* in «Nature», 394, pp. 369-374, 1998.