

Staminali riprogrammate contro la cecità

Colloquio con Vania Broccoli, che dirige l'Unità "Cellule staminali e Neurogenesi" dell'Istituto Scientifico San Raffaele

L'INTERVISTA

G. Galante

Le cellule adulte possono ringiovanire e tornare staminali. Questo 'miracolo' della ricerca è basato sull'azione di alcuni geni che vengono inseriti temporaneamente nel Dna di cellule di qualunque tessuto umano. Si tratta di una sorta di viaggio all'indietro nel tempo biologico che può risparmiare ai ricercatori il problematico ricorso alle staminali embrionali. Questo è, in sintesi, ciò che sostiene il dott. Vania Broccoli, che dirige l'Unità "Cellule staminali e Neurogenesi" dell'Istituto Scientifico San Raffaele di Milano.

Cosa ci dice delle ricerche che conduce sulle staminali?

Il S. Raffaele è sempre stato all'avanguardia nel campo delle staminali. Io, quando sono stato all'estero, ho lavorato su quelle embrionali, ad esempio in Germania. A parte i risvolti etici, queste cellule hanno potenzialità enormi...

Qual è l'obiettivo a cui si punta con le staminali embrionali?

A livello oculare si mira soprattutto a differenziarle per ottenere cellule retiniche. Quindi, sono stati pubblicati lavori importanti, ma queste cellule nell'uomo saranno difficilmente utilizzabili in Italia (così come in molti altri Paesi del mondo) perché, per generare queste linee cellulari, bisogna 'sacrificare' embrioni precocissimi. Utilizzare tali cellule in maniera 'futuribile' necessiterebbe l'impiego di molti embrioni umani.

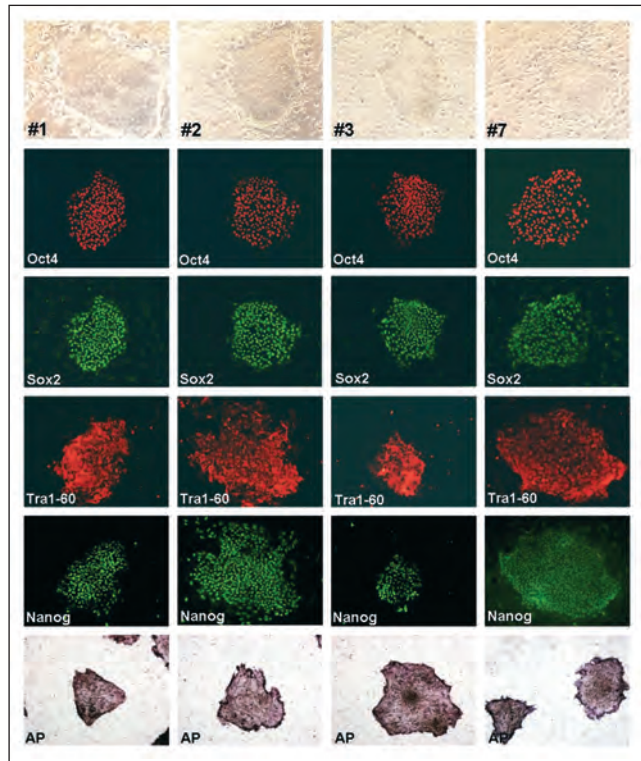
Oggi esiste un'alternativa valida?

Sì, questa disputa è perlopiù risolta grazie a un'innovazione tecnologica che risale al 2006: si tratta della tecnica della riprogrammazione genetica, che utilizza quattro geni che hanno la capacità di riprogrammare cellule mature del nostro corpo (dei nostri tessuti). Per facilità di prelievo si utilizzano cellule della pelle (quattro millimetri quadrati della nostra cute). Vengono riprogrammate fino a diventare cellule staminali come quelle embrionali¹: sono da tutti i punti di vista indistinguibili. Dunque, oggi dispo-

**"POSSIAMO
OTTENERE
STAMINALI
RIPROGRAMMATE
DA QUALUNQUE
CELLULA ADULTA"**



V. Broccoli, capo dell'Unità di cellule staminali, Istituto Scientifico San Raffaele di Milano



Cellule staminali riprogrammate

niamo di una nuova tecnologia che consente di avere a disposizione staminali – efficaci come quelle embrionali – che però possiamo derivare da ogni singola cellula adulta di ciascuna persona: si tratta di un salto concettuale non indifferente. Per ora, tuttavia, trattandosi di una tecnologia giovane è ancora cara.

**“LA RETINA
POSSIEDE
UNA LIMITATA
CAPACITÀ
AUTORIGENERA-
TIVA SPONTANEA”**

Quali sono i principali problemi a cui si può andare incontro?

Noi inseriamo nel Dna delle cellule adulte quattro geni (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc). Questo inserimento, essendo casuale, potrebbe causare problemi come la rottura del codice genetico. Noi, comunque, possiamo inserire i geni in punti specifici del Dna, evitando così di danneggiarlo. Poi questi quattro geni – una volta che è stata ottenuta la cellula staminale riprogrammata – si possono togliere: in questo modo la cellula ha il Dna identico a quello iniziale. Si tratta di una sorta di innesco genetico: le staminali ottenute sono identiche a quelle embrionali e si mantengono per sempre.

Come si evolvono?

Le cellule cambiano: tendono a crescere come piccole isole in un oceano, si attaccano strettamente l’una all’altra, assumendo la tipica morfologia delle staminali embrionali. Queste cellule diventano per l’esattezza staminali pluripotenti: ciò significa che possono diventare fibre muscolari, neuroni, cellule ematiche, retiniche, ecc.

Perché non totipotenti?

In realtà l’unica cellula totipotente è lo zigote, che si origina dall’unione dell’ovulo e dello spermatozoo. Dunque, il termine esatto per le staminali embrionali è solo ‘pluripotenti’, come quello delle cellule staminali riprogrammate (iPS).

Cosa accadrebbe se si iniettassero *in vivo* staminali?

Si otterrebbe un tumore: le staminali, in un tessuto adulto, mantengono la proliferazione, ma non ricevendo i segnali biologici giusti si sviluppano in modo incontrollato...

In vitro, invece?

In vitro sono un’arma molto utile e potentissima; però vanno istruite prima di inserirle in qualche organismo. Ad esempio, possiamo istruirle a diventare progenitori delle cellule retiniche. Dunque, bisogna trovare dei segnali biologici per ‘indirizzarle’, orientando così correttamente il loro sviluppo. Tutti i protocolli degli studi di embrionale classica si possono utilizzare già da subito anche su queste cellule riprogrammate. Il fine è generare precursori retinici che, una volta trapiantati, possono diventare fotorecettori (trattandosi di cellule dal funzionamento molto complesso, parliamo di uno degli obiettivi più ambiziosi).

Cosa sono i precursori?

Sono già cellule di retina, che ancora proliferano ma sono capaci di diventare, ad esempio, sia coni che bastoncelli. Oppure possono diventare interneuroni retinici o, ancora, glia

di Müller retinica. Dunque, è un precursore ideale...

Come si fa a dire in anticipo cosa diventerà un precursore?

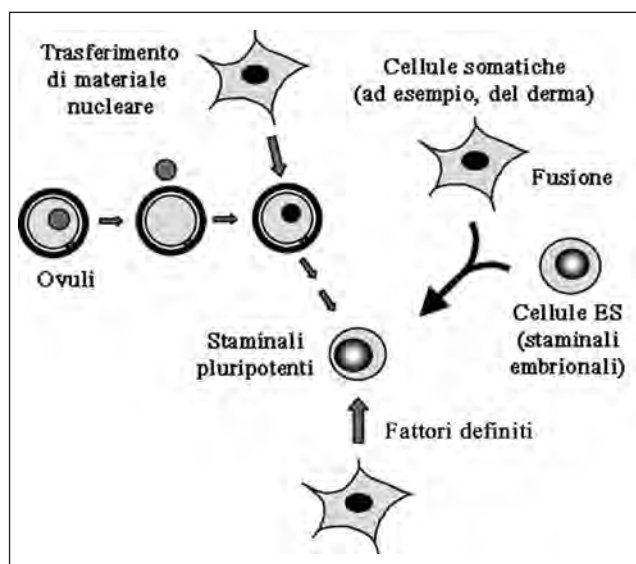
Per il 60% tende a diventare un fotorecettore e per il 40% un interneurone (almeno nel topo). Sono entrambi necessari per riparare in qualche modo la retina. Noi sappiamo, almeno in vitro, come si potrebbe indirizzare una staminale.

Che risultati si sono ottenuti con le staminali embrionali sulla retina?

Un gruppo giapponese (diretto dal Prof. Takahashi, Kobe) e uno americano (diretto dal Prof. Reh, Seattle), che hanno lavorato indipendentemente, hanno pubblicato due studi sulle cellule staminali embrionali (indotte *in vitro* in precursori retinici), dimostrando che sono capaci di integrarsi in una retina di un topo. Io sono un esperto di cellule staminali e ho molta esperienza nel differenziamento del cervello. Il fatto di avere questa competenza nel campo delle staminali embrionali mi ha dato lo stimolo per condurre questo tipo di studi.

Le cellule riprogrammate potranno essere utilizzate con successo per rigenerare la retina?

Sì. Non dimentichiamo che la terapia genica (per curare malattie quali la Best, la Stargardt, ecc.) sta dando degli ottimi risultati. Però quest'approccio, anche se può essere considerato la via maestra, ha dei limiti: una volta perso il tessuto retinico non si possono far rinascere i fotorecettori. Dunque, la strada delle staminali riprogrammate può essere complementare: da un lato si può intervenire con la terapia genica – se i fotorecettori sono preservati –; infatti, reinserire il gene danneggiato è il metodo per poterlo curare in modo definitivo. Però, ovviamente quest'approccio ha un campo di applicazione che può essere limitato solo a quelle patologie che non causano la morte precoce dei fotorecettori o



Tre metodi per ottenere cellule somatiche pluripotenti, che possono trasformarsi nella maggior parte dei tessuti umani

degli interneuroni retinici. A questo punto bisogna pensare a una terapia sostitutiva...

Dunque che soluzione si sta cercando?

Se si trovassero i segnali biologici per far crescere queste staminali nel modo voluto, la strada sarebbe percorribile. La retina ha persino una certa capacità autorigenerativa spontanea, in particolare nel margine ciliare (la zona periferica); parliamo anche dalla retina umana. Però queste staminali hanno una bassa capacità rigenerativa: in laboratorio non crescono o crescono pochissimo. Infatti, se ne ottengono così poche che non sono sufficienti per nessun tipo di terapia (inoltre potrebbe essere un problema il prelievo di una zona retinica). Invece, noi ci siamo concentrati su quelle embrionali: la cellula iniziale è molto potente, cresce benissimo in vitro ed è efficiente nel diventare un precursore della retina. Rimane però un problema: normalmente, se queste cellule non vengono trattate, possono generare tumori.

“SE LE STAMINALI NON VENGONO TRATTATE CORRETTAMENTE POSSONO GENERARE TUMORI”

Può spiegare meglio questo rischio di produzione tumorale?

Supponiamo che noi otteniamo precursori retinici in misura del 90%: il restante 10% lo togliamo dalla coltura, ma anche se rimane

una piccola contaminante si possono generare tumori. Dunque, si possono iniettare staminali sotto alla retina, ad esempio facendo uso di una popolazione pura di cellule riprogrammate. In sostanza noi effettuiamo iniezioni sotto-retiniche nel topo; lì le cellule si trovano a contatto direttamente con la retina ospite e si differenziano in fotorecettori, interneuroni e glia retinica. Quello che noi stiamo facendo è di trovare un metodo ideale per ottenere i precursori della retina dalle staminali riprogrammate; ma i trapianti nel topo di cellule umane non li abbiamo ancora sperimentati... Eppure una cellula umana può integrarsi senza problemi in una retina di topo; ma è altrettanto importante avere un protocollo di laboratorio affinché le cellule riprogrammate umane diventino precursori retinici.

In futuro quali malattie oculari della retina potremo curare con le staminali?

Si potranno trattare molte malattie in cui si verifica una perdita di fotorecettori o di altri parti del tessuto retinico. In realtà è una tecnica che rimane sempre più o meno uguale, ma può essere applicata a tante patologie della retina (di tipo degenerativo, ad esordio precoce o tardivo). Ci potranno essere persino applicazioni alle maculopatie, forse però in un secondo tempo. Il vantaggio importante di questa terapia è che non dobbiamo conoscere la genetica della malattia: semplicemente è una ‘sostituzione’ cellulare che funziona in ogni caso...

Come si può evitare di creare un tumore?

Ci sono due o tre tecnologie per evitare la proliferazione tumorale: c’è la possibilità di selezionare alla fonte le cellule staminali con un margine di sicurezza enorme. Non dimentichiamoci, inoltre, che parliamo di staminali autologhe (non provocano rigetto) e hanno un grande vantaggio anche rispetto alle embrionali. Comunque, le staminali devono essere ben isolate e ben caratterizzate: bisogna prendere quelle giuste per ottenere dei buoni risultati.

Ho sentito di scienziati che hanno iniettato sperimentalmente staminali alla rinfusa e poi sono rimasti delusi dai risultati...

Non è assolutamente vero che le staminali curino tutto: bisogna selezionare un precursore particolare, ma negli anni scorsi sono state anche usate delle scorciatoie inopportune per far risaltare il lavoro di qualche specialista clinico; invece, bisogna avere più pazienza, individuando il procedimento giusto e ben fatto ai fini di una corretta applicazione clinica.

C’è una nuova tecnica utilizzata da un ricercatore americano, può spiegarci i vantaggi?

Il vantaggio è che non occorre un vettore virale: la scoperta Thomson è che non c’è modificazione nel Dna (fibroblasti riprogrammati), per cui il genoma delle staminali è inalterato. Questa nuova procedura messa a punto negli Usa permette di derivare le staminali dai fibroblasti con una metodica sicura da tutti i punti di vista: queste staminali, essendo identiche alle embrionali, hanno il problema che possono – se non differenziate nel modo opportuno – dare origine (anche se lentamente e col tempo) a tumori: qui mancano ancora strategie sicure al mille per mille che permettono di utilizzare queste cellule. Questo non è legato alla riprogrammazione, ma al fatto che lavoriamo sulle staminali, che possono ‘impazzire’ e dare origine a un tumore: penso però che nel giro di pochissimo il problema sarà risolto. Lavorando su singole cellule che possiamo riprogrammare e ringiovanire fino a farle ridiventare embrionali, ma farlo per un intero organo è un altro discorso (ad oggi è fantascienza, perché bisognerebbe far sviluppare molti tipi di cellule; però la scienza procede a salti... superando anche la fantasia).

Può servire ancora lavorare su staminali non riprogrammate?

Avere delle staminali standard può ancora essere utile: io non abbandonerei del tutto questa strada.

Su cosa state lavorando più in generale?

Su neuroni di diverse classi e fotorecettori. Noi siamo i primi in Italia ad avere queste cellule” e tra i primi in Europa ad ottenere cellule umane riprogrammate. Infatti, le forniamo ad altri gruppi di ricerca interessati a fare queste differenziazioni. Noi studiamo anche come curare il morbo di Parkinson: ciò che ci interessa maggiormente sono i neuroni dopaminergici (che hanno

come neurotrasmettitore la dopamina). Il Parkinson è la malattia neurodegenerativa che più facilmente potrebbe essere curata con la terapia cellulare a base di staminali.

Note:

1 Si tratta delle IPS (*Induced Pluripotent Stem Cells*) ossia delle staminali pluripotenti indotte oppure staminali somatiche riprogrammate.

CHI È VANIA BROCCOLI

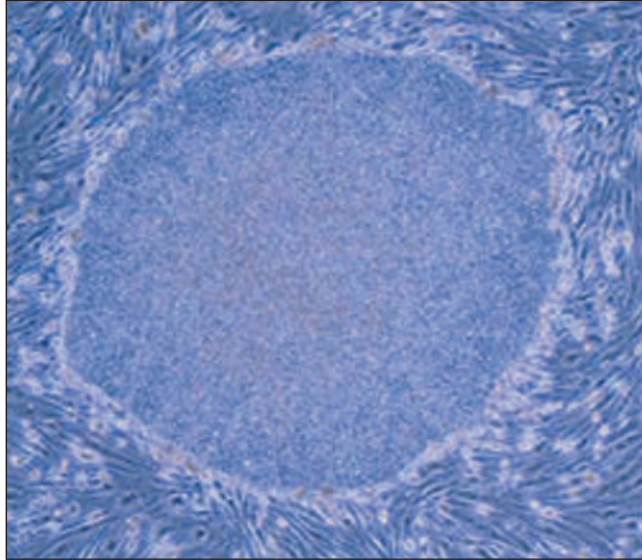
Vania Broccoli è uno dei vincitori del Bando di concorso del Polo Nazionale Ipo-visione, struttura sanitaria dell’Agenzia internazionale per la prevenzione della cecità ospitata presso l’Ospedale A. Gemelli di Roma. Il suo progetto di ricerca si focalizza sulla cura delle distrofie retiniche ereditarie mediante cellule staminali (“Cellule pluripotenti riprogrammate, da utilizzare come fonte rinnovabile a lungo termine come progenitrici dei fotorecettori, nelle distrofie retiniche del topo e dell’uomo per la terapia sostitutiva con cellule immunomarcate”).

Broccoli si è laureato nel 1993 in Scienze Biologiche all’Università di Bologna, per poi conseguire un dottorato in Scienze Genetiche presso il laboratorio di biologia diretto dal Prof. E. Boncinelli (DIBIT, Università Vita-Salute del S. Raffaele di Milano). Negli anni 1996-1998 ha conseguito il postdottorato in neurogenetica molecolare presso il laboratorio diretto dal Prof. W. Wurst del Max Planck Institute di Psichiatria di Monaco (Ger-

mania). Dal 1998 al 2000 ha lavorato presso l’Istituto Telethon (TIGEM) diretto dal Prof. A. Ballabio. Nel 2001 è entrato nello staff dell’Istituto che si occupa di ricerca sulle cellule staminali presso il S. Raffaele di Milano: studia, in particolare, i meccanismi genetici della differenziazione neurale. Ha trascorso diversi periodi all’estero, recandosi nei laboratori del CNRS di Parigi (*École Normal Supérieure*) diretti dal Prof. M. Wassef. Inoltre, ha lavorato nel laboratorio di neurobiologia dello sviluppo del Prof. J. Rubenstein, Università di San Francisco (UCSF), negli USA. È stato, quindi, a Londra per studiare lo sviluppo cerebrale, nel dipartimento diretto dal Prof. A. Simeone (MRC *Centre for Developmental Neurobiology*). È tra i revisori di riviste scientifiche come *Developmental Biology* e *lo European Journal of Neuroscience and Development*. Attualmente è a capo dell’Unità di “Cellule staminali e neurogenesi”, la Divisione di Neuroscienze dell’Istituto Scientifico San Raffaele.

COSA SONO LE STAMINALI?

Le staminali sono cellule dette “immature” perché la loro principale caratteristica è



Cellule staminali riprogrammate derivate dal derma di adulti umani

quella di potersi specializzare, cioè di diventare qualunque tessuto e organo del nostro corpo. Purtroppo non tutti i tessuti sono forniti di zone ove si producono staminali, mentre allo stadio iniziale di sviluppo dell'embrione tutte le cellule sono in questo stato (vengono dette 'totipotenti'). Detto in altri termini, possono essere considerate cellule "bambine" che ancora non hanno scelto cosa fare da "grandi": possono essere usate per rigenerare diverse parti dell'organismo, tra cui i tessuti oculari.

Come si ottengono le staminali?

L'embrione è il bacino delle staminali per eccellenza, ma per problemi etici il loro studio è molto limitato e in Italia è del tutto vietato. Ovviamente, man mano che l'embrione si sviluppa, le cellule si specializzano e, dunque, perdono la loro capacità di trasformarsi in tutti i tipi di

cellula. Però, se si vuole dare la possibilità a chi nascerà di avere alcune "cellule di ricambio" (come quelle ematiche, muscolari o nervose), c'è almeno la possibilità di conservare il cordone ombelicale. Le staminali sono contenute, inoltre, nel liquido amniotico. Infine, esiste la possibilità di ottenere staminali da cellule adulte; questa tecnica richiede una 'riprogrammazione' genetica. Si usano cioè quattro geni diversi (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) per avviare una sorta di ringiovanimento cellulare della cellula adulta, che torna così allo stadio di staminale; una volta avviata questa trasformazione cellulare i geni che hanno funzionato da 'innescò' vengono eliminati dal Dna della cellula che si intende 'ringiovanire'. Le staminali riprogrammate (iPS) sono pluripotenti e rappresentano una frontiera che probabilmente sarà foriera di ulteriori e interessanti sviluppi. Importanti risultati si sono ottenuti fino ad oggi anche negli Stati Uniti.

Nell'adulto si trovano le cellule staminali?

Sì, in un adulto si possono ottenere, ad esempio, dal midollo osseo (staminali emopoietiche), dal tessuto adiposo e da una serie di zone specifiche deputate alla produzione delle staminali stesse. Per quanto riguarda gli occhi, nella cornea è ad esempio presente una zona chiamata limbus, che si trova al confine con la sclera (il bianco dell'occhio). Nella retina, invece, l'uso delle staminali è più complesso e saranno necessarie molte più ricerche prima che si riesca a riparare tramite innesto cellulare.

CHI HA SCOPERTO LE CELLULE STAMINALI RIPROGRAMMATE?

Si tratta di un ricercatore giapponese, Shinya Yamanka, che insegna presso l'Università

di Kyoto.

L'articolo miliare risale al 2006 e si intitola "Le cellule staminali riprogrammate (iPS) sono indistinguibili dalle staminali embrionali (ES) da molti punti di vista" (*Nat Biotechnol.* 2008 Jan; 26(1):101-6).

In articolo pubblicato il 27 giugno 2008 sui *Philosophical Transactions of the Royal Society* il docente giapponese sottolineava che "la riprogrammazione del nucleo delle cellule umane può essere ottenuta grazie alla combinazione di un piccolo numero di fattori" (ad esempio dei geni Oct3/4, Sox2, Nanog e Lin 28).

Nella stessa pubblicazione si sottolinea che le cellule staminali embrionali rimangono comunque una strada promettente; tuttavia, "come nel caso dei trapianti d'organo, la reazione immunitaria che segue al trapianto è un problema potenziale" senza toccare al contempo i seri problemi etici che implica ('sacrificare' una vita *in nuce* per



Shinya Yamanaka, Università di Kyoto

un adulto).

Tutte queste questioni – prosegue il Prof. Yamanka – "possono essere risolte se le cellule staminali pluripotenti vengono generate da quelle somatiche".

STAMINALI DA NOBEL

Il 13 maggio si è tenuta una giornata di studio presso l'Università degli Studi di Milano intitolata "Le cellule staminali embrionali e la riprogrammazione". Dopo l'Apertura di rito è intervenuto Martin Evans, Premio Nobel per la medicina 2007, professore presso la *Cardiff School of Biosciences* (Gran Bretagna). Durante la sua 'lezione' ha trattato la questioni connesse all'uso delle staminali embrionali di topo, raccontando la storia del loro isolamento e del loro sviluppo nonché del loro impiego come veicolo per la manipolazione genetica. Tutto ciò ha portato – scrive Evans – "a studiare una mutazione mirata in fino a un terzo dei *loci genetici*¹: l'attuale programma internazionale mira a provocare una mutazione in ogni *locus*

del topo". Bisogna considerare però che non si tratta di sterili esperimenti da scienziati pazzi. Infatti, osserva Evans, "le popolazioni di staminali e quelle dei precursori delle cellule costituiscono la base di gran parte dello sviluppo e del mantenimento dei tessuti"; rigenerandoli, un giorno si potrà guarire da numerose malattie ereditarie (tra cui, ovviamente, quelle oculari). Infine il Premio Nobel ha citato il suo ultimo lavoro, condotto con illustri colleghi, nel quale ha indicato esattamente dove si originino le cellule staminali nell'embrione delle cavie da laboratorio.

Note:

¹ Luoghi occupati da un carattere nella mappa genetica (genoma) ossia ordine esatto di una determinata sequenza nel Dna.