

NUOVE FRONTIERE TERAPEUTICHE DERIVANTI DALLA RIPROGRAMMAZIONE DELLE FUNZIONI DEL GENOMA

di Silvia Garagna, Carlo Alberto Redi e Maurizio Zuccotti

Parkinson, sclerosi multipla, diabete, osteoartrite, malattie del fegato e del rene, infarto, nessuna di queste malattie degenerative al presente può essere guarita. Le liste di attesa per poter accedere a reni e cuori donati sono lunghe, semplicemente non ci sono a sufficienza organi per trapianti (ancora meno da quando le cinture di sicurezza sono obbligatorie per legge). Se i chirurghi avessero a disposizione cellule vitali ad esempio del cervello, fegato, rene, cuore o muscolo, potrebbero curare molte di queste malattie e riparare gli organi danneggiati.

Le cellule staminali potrebbero rappresentare la soluzione. Le cellule staminali sono cellule non specializzate che costantemente rinnovano tessuti quali la pelle, se alterati, traumatizzati o in seguito a malattia. Esse possono essere isolate in basso numero da tessuti adulti ed in maggiori quantità dai feti abortivi, sebbene queste cellule staminali abbiano una vita limitata e al di fuori del corpo non si moltiplichino per molti cicli cellulari. Più promettenti, per una terapia, sono le cellule embrionali staminali, l'impiego delle quali presenta però problemi di natura etica.

Diviene quindi cruciale la conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano il differenziamento cellulare, al fine di poter controllare e riprodurre questo processo, per la comprensione dei processi differenziativi coinvolti nella progressione di malattie genetiche e per la loro terapia. Simili studi non possono essere condotti in modo sistematico su reagente biologico umano, per delle chiare limitazioni etiche nell'uso di embrioni umani. Recentemente è stata dimostrata la possibilità di ottenere un completo sviluppo embrionale da nuclei di cellule somatiche terminalmente differenziate trasferiti in oociti (enucleati) di topo. Questi esperimenti dimostrano la capacità dell'oocita di topo di rimodellare il programma genetico del nucleo di una cellula somatica differenziata così da renderlo capace di iniziare e proseguire lo sviluppo embrionale. L'attivazione di "geni embrionali" avviene nel topo a partire dallo stadio di due cellule e rappresenta un evento cruciale nella vita dell'embrione, poiché la mancata o scorretta attivazione dell'espressione di geni embrionali determina la morte dell'embrione stesso.

La maggior parte delle patologie che affliggono l'Uomo sono dovute all'alterazione funzionale e strutturale dell'integrità di organi o tessuti. Molti sono gli approcci terapeutici mirati alla cura di tali patologie, ma ad oggi la più promettente risulta spesso legata al trapianto di quegli organi o tessuti alterati o distrutti dalla malattia. Nella maggior parte dei casi il trapianto viene effettuato utilizzando organi provenienti da donatori morti o più raramente da donatori viventi. Purtroppo, sia la scarsità degli organi da trapiantare che la necessità di terapie immunosoppressive per evitare il rigetto, limitano l'impiego del trapianto eterologo in molti pazienti che ne potrebbero beneficiare. Le cellule staminali di derivazione embrionale, fetale, da cordone ombelicale o

adulte per le loro capacità di differenziamento potrebbero essere utilizzate per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche capaci di sostituire le attuali tecniche di trapianto di organo intero.

Gli importanti risultati raggiunti in questi anni dalla ricerca nell'ambito della biologia dello sviluppo hanno generato grandi speranze ed aspettative sull'impiego delle cellule staminali in questo ambito. Queste ricerche promettono la produzione di nuove cellule e tessuti, forse anche organi, per lo sviluppo di nuove terapie per la cura del morbo di Parkinson, l'Alzheimer, l'infarto, il tumore, il diabete e molte altre patologie degenerative. La tabella 1 pone in evidenza l'entità di queste malattie nella popolazione statunitense ed in quella italiana.

Tabella 1. Incidenza di alcune patologie degenerative in USA ed in Italia

MALATTIE	NUMERO DI PERSONE AFFETTE (milioni)	
	USA	ITALIA
Cardiovascolari	58	9,5
Diabete	16	2,1
Osteoporosi	10	2,2
Tumori	8,2	0,5
Alzheimer	4	0,5
Parkinson	1,5	0,033
Congenite	0,15 (per anno)	0,016 (per anno)
TOTALE	97,85	14,85

Se si considerano nella sola popolazione italiana le persone affette da malattie croniche, il numero totale di malati

raddoppia, rappresentando ben il 51% dell'intera popolazione (57 milioni) (tabella 2).

Tabella 2. Incidenza di alcune patologie croniche in Italia

MALATTIE CRONICHE	N. DI PERSONE AFFETTE (milioni)
Diabete	2,15
Cataratta	0,58
Infarto del miocardio	0,87
Angina pectoris	0,64
Altri disturbi del cuore	2,08
Trombosi, Embolia, Emorragia cerebrale	0,52
Bronchite cronica, Enfisema	2,72
Asma bronchiale	1,68
Artrosi, Artrite	10,90
Osteoporosi	2,20
Ulcera gastrica o duodenale	2,15
Cirrosi epatica	0,17
Cancro (inclusi linfoma, leucemia)	0,52
Disturbi nervosi (Perdita di memoria, Parkinson..)	1,57
Paralisi e paresi	0,46
TOTALE	29,21

Fonte: ISTAT, 1994

Le nuove frontiere terapeutiche per affrontare la cura delle malattie croniche e degenerative dipendono dall'impiego di cellule staminali opportunamente differenziate (1-5). La tabella 3 mostra per le diverse patologie i tipi cellulari necessari alla cura.

Negli ultimi anni sono stati individuati nuovi distretti tissutali da cui prelevare cellule pluripotenti, sono state migliorate le metodiche per il loro isolamento e la loro

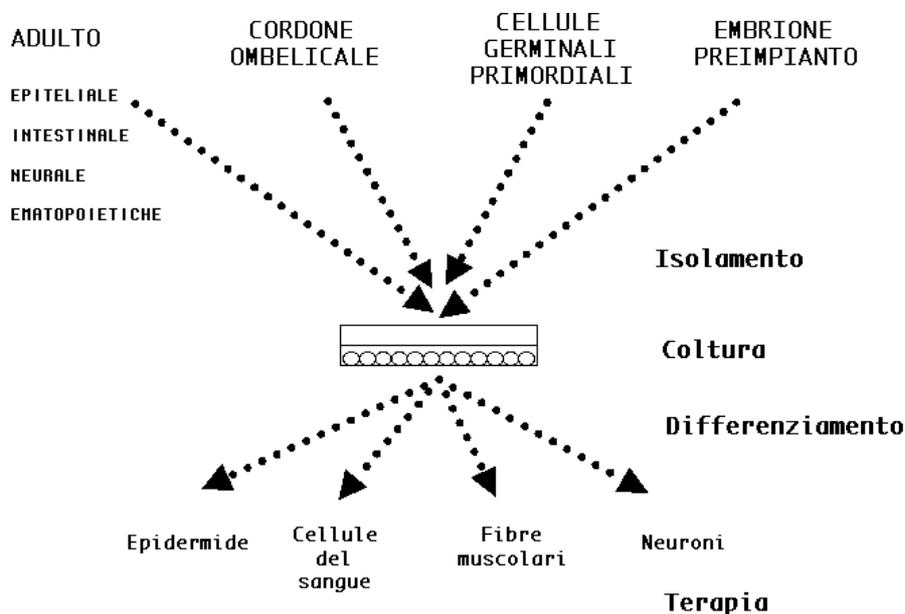
coltura ma, soprattutto, è stata dimostrata la possibilità di dedifferenziare il genoma di una cellula somatica terminalmente differenziata ridando ad esso le caratteristiche di totipotenzialità che possedeva nello zigote.

Nell'ambito degli studi sul differenziamento delle cellule staminali si delineano tre scenari o strategie di ricerca tutte necessarie per poter raggiungere i risultati attesi nel piu' breve tempo possibile.

Tabella 3. Patologie e cellule indicate per il trapianto

PATOLOGIE	CELLULE DA TRAPIANTARE
Alzheimer	nervose
Aterosclerosi	endoteliali
Bruciature	epiteliali
Dolori cronici	cromaffini
Diabete	Langherans
Epilessia	nervose
Cardiache	cardiomiociti
Huntington	cellule nervose
Ipocalcemia	paratiroidi
Ipocolesterolemia	epatociti
Renali	renali
Leucemia	ematopoietiche
Epatiche	epatociti
Degenerazione della retina	cellule della retina
Sclerosi multipla	gliali
Osteoartrite	condrociti
Parkinson	neuroni dopaminergici
Artrite reumatoide	condrociti
Danni alla spina dorsale	nervose
Infarti	cardiociti

Figura 1.



Le cellule staminali possono essere isolate da alcuni tessuti adulti, dal cordone ombelicale e dal nodo embrionale della blastocisti preimpianto (ES cells), quest'ultima ottenuta attraverso le tecniche di fecondazione in vitro oppure

successivamente al trasferimento di un nucleo somatico nel citoplasma di un oocita enucleato (figura 1). Dopo l'isolamento, le cellule staminali vengono coltivate per aumentarne il numero e successivamente, aggiungendo al terreno di coltura fattori

opportuni, vengono differenziate così da ottenere cellule del fenotipo desiderato da impiegarsi in terapia medica.

Con il procedere dello sviluppo embrionale e fetale il numero di cellule staminali si riduce fino ad essere presenti solo in alcuni precisi distretti tissutali ben riconoscibili nell'individuo adulto.

Dall'embrione preimpianto allo stadio di blastocisti si possono isolare le cellule che compongono il nodo embrionale (cellule che daranno origine all'embrione vero e proprio), coltivarle fino ad ottenerne migliaia, le cosiddette cellule embrionali staminali (ES cells, Embryonic Stem Cells) la cui caratteristica principale è la elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare (tabella 4). Cellule ES di topo sono state differenziate *in vitro* in cellule epiteliali, muscolari, nervose o pancreatiche. Quando differenziate in cellule della glia, un tipo di cellula nervosa che produce lo strato di mielina che ricopre le fibre nervose, e trasferite nel cervello di topi le cui cellule non erano in grado di produrre la mielina, sono state in grado di ristabilire una normale attività sintetica di questa proteina (6). Cellule ES sono state anche differenziate in cellule nervose immature che quando trasferite nella spina dorsale danneggiata di ratti, ne hanno ristabilito le normali funzioni (per una rassegna si veda 7).

Sebbene ad oggi queste ricerche e tecnologie siano state condotte e sperimentate soprattutto su modelli animali, i loro sviluppi potrebbero essere altrettanto positivi anche per l'uomo. Nel 1998 cellule ES sono state ottenute da blastocisti umane al quattordicesimo giorno di sviluppo (8). Le blastocisti provengono dalle cliniche di fecondazione *in vitro* e sono embrioni in eccesso che non sono stati trasferiti nell'utero della madre, ma con il consenso dei genitori utilizzate per la ricerca. Uno studio successivo ha anche dimostrato le

potenzialità che hanno le cellule ES umane di differenziarsi, come quelle di topo, in altri tipi cellulari (9).

Nell'embrione postimpianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, ma difficile è il loro isolamento. Tra le più studiate sono sicuramente le cellule germinali primordiali (PGC, Primordial Germ Cells) che rappresentano lo stadio di differenziazione che precede la formazione delle gonadi. Le PGC fanno la loro comparsa alla 1^a e 3^a settimana di sviluppo nell'embrione di topo e umano rispettivamente. Se isolate dall'embrione queste cellule sono in grado di moltiplicarsi e produrre cellule pluripotenti dette EG (Embryonic Germ cells) in grado anche queste, come le cellule ES, di differenziarsi in quasi tutti i tipi cellulari presenti nell'individuo adulto (tabella 5). La loro difficile reperibilità ne ostacola però fortemente il possibile impiego quale sorgente di reagente biologico utile nel trattamento terapeutico di tante patologie.

Nell'individuo adulto si trovano cellule staminali in diversi distretti tissutali differenziati: nel midollo spinale, nell'epitelio seminifero della gonade maschile, nella retina, negli epiteli, nel cervello. Se le cellule staminali di ciascuno di questi distretti vengono isolate e opportunamente coltivate è possibile espanderle di numero e differenziarle nel tipo cellulare specifico del distretto tissutale da cui derivano o anche transdifferenziarle ottenendo così, ad esempio, cellule del sangue a partire da cellule staminali nervose (tabella 6). Quindi, la possibilità di differenziare cellule provenienti da un determinato foglietto embrionale in cellule di un altro foglietto diverso da quello d'origine fa crollare un dogma fondamentale dell'embriologia (10) ed apre enormi possibilità di impiego terapeutico nella ricostruzione tissutale cellulo-mediata di tipo autologo.

Tabella 4. Potenzialità differenziative delle cellule embrionali staminali

Stem cell type isolated	In vitro expansion	Organism	Differentiation in vivo / in vitro	Cell type obtained	
ES	Yes	mouse	in vitro	germ-line competent ES cell	1
ES	Yes (4-5 m)	human	in vitro	Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives	2
ES		mouse	in vitro	Primitive endoderm, parietal endoderm, visceral endoderm, primitive ectoderm, mesoderm precursors, blood islands, endothelial cells, vascular channels, hematopoiesis, erythroid, myeloid, lymphoid, chondrocytes, skeletal muscle, smooth muscle, cardiac muscle, endodermal, neuroectoderm. neurons, glial, epithelial, keratinocytes, melanocytes, steroidogenic lineages	3
ES	Yes	rat	in vitro	oligodendrocytes, astrocytes (transplanted in rats with myelin disease)	4
ES	Yes	human	in vitro	neural progenitors, neurons	5
ES EPL (early primitive ectoderm)	Yes	mouse	in vitro	Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives Embryoid bodies lacking visceral endoderm	6
ES	Yes (more than 1 year)	rhesus monkey	in vitro in vivo (mouse transplant)	Trophoblast, endoderm Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives	7
ES	Yes	rhesus monkey	in vivo (mouse transplant)	Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives, neural tube, embryonic ganglia, neurons	8
ES	Yes (more than 1 year)	common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)	in vitro	trophoblast, endoderm differentiation, embryoid body	9
ES-derived cardiogenic region from embryoid body	yes	mouse	in vitro	cardiomyocytes	10
ES	Yes	Golden hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	in vitro	EB	11
ES Blastoderm	Yes	chick	in vitro	Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives	12
ES preimplantation blastocysts	Yes	porcine (<i>Sus scrofa</i>)	in vitro	EB, Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives, fibroblasts, adipocytes, epithelial, neuronal, muscle	13
ES morulae blastocysts ICM	Yes	mink (<i>Mustela vison</i>)	in vivo (athymic mouse)	EB, Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives less differentiation potential EB, Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives	14

1. Brook and Gardner PNAS 94: 5709-5712, 1997

2. Thompson et al., Science 282: 1145-1147, 1998

3. REVIEWED IN: Rathjen et al., Reprod. Fert. and Dev. 10: 1-17, 1998

4. Brustle et al., Science 285: 754-756, 1999

5. Reubinoff et al., Nature Biotechnology 18: 399-404, 2000

6. Lake et al., J. Cell Sci. 113: 555-566, 2000

7. Thomson et al., PNAS 92: 7844-7848, 1995

8. Thomson et al., APMS 106: 149-156, 1998

9. Thomson et al., Biol Reprod 55: 254-259, 1996

10. Klug et al., Am. J. Physiol. 269: 1913-1921, 1995

11. Doetschman et al., Dev Biol. 127: 224-227, 1988

12. Pain et al., Development 122: 2339-2348, 1996.

13. Wheeler, Reprod. Fert. Dev. 6: 563-568, 1994

14. Sukoyan et al., Mol. Reprod. Dev. 36: 148-158, 1993

Tabella 5. Potenzialita' differenziative delle cellule germinali primordiali

Stem cell type isolated	In vitro expansion	Organism	Differentiation in vivo / in vitro	Cell type obtained	
PGC	Yes (20-25 passages)	Human (5-9 weeks post fertilization)	in vitro	Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives	1
PGC	Yes	Mouse	in vitro	Gonocytes	2
EG (Embryonic Germ-PGC derived)	Yes	Porcine (24-25 days embryo)	in vitro in vivo (host blastocyst injection)	embryoid bodies, endodermal, trophoblast, epithelial, fibroblast, neuron-like cells chimeric piglet	3
EG (PGC derived)	Yes	mouse	in vitro	cardiac, skeletal muscle, neuronal cells	4

1 Shambloott et al., PNAS 95: 13726-13731, 1998

2 Richards et al., Biol. Reprod. 61: 1146-1151, 1999

3 Shim et al., Biol. Reprod. 57: 1089-95, 1997

4 Rohwedel et al., Cell. Biol. Int. 20: 579-87, 1996

Tabella 6. Potenzialita' differenziative delle cellule staminali neonatali e adulte

Stem cell type isolated	In vitro expansion	Organism	Differentiation in vivo / in vitro	Cell type obtained	
Bone marrow	Yes (7-10 d)	mouse	in vivo	bone, cartilage, connective tissues	1
Neural (forebrain)	Yes	mouse	in vivo	blood	2
Bone marrow	No	mouse	in vivo	muscle	3
Muscle	Yes (cell selection)	mouse	in vivo	blood	4
Bone marrow	Yes (12 d)	mouse	in vivo in vitro	astrocytes condrocytes adipocytes	5
Bone marrow	No	rat	in vivo	epatocytes	6
Bone marrow	Yes (10 d)	human	in vitro	adipogenic, condrogenic, osteogenic lineages	7
Neural (central nervous system)	Yes	human	in vivo in rat	Neurons Astrocytes	8
Neurons from hyppocampus	Yes (14 d)	human	in vitro	Astrocytes Neuron-like cells	9
Neural	Yes	mouse	In vivo Stage 4 chick embryo Mouse Morula/Blastocyst	Ectodermal, mesodermal, endodermal derivatives	10
Retinal	Yes	mouse	in vitro	Retinal cells	11
Neural (cerebellum) neonatal	Yes	mouse	in vivo	Oligodendrocytes (cure for dysmyelinated neurons)	12
Neural (periventricular region)	Yes Not feasible	Mouse Human	in vitro in vivo in vivo (mouse transplanted)	Myoblasts Myoblasts	13
Mononuclear (peripheral blood)	Yes	Dog	in vitro in vivo (dog)	CD34+ precursors White blood cells	14

1 Pereira et al., PNAS 92: 4857-4861, 1995

2 Bjornson et al., Science 283: 534-537, 1999

3 Ferrari et al., Science 279: 1528-1530, 1998

4 Jackson et al., PNAS 96: 14482-86, 1999

5 Kopen et al., PNAS 96: 10711-10716, 1999

6 Petersen et al., Science 284: 1168-1170, 1999

7 Pittenger et al., Science 284: 143-147, 1999

8 Svendsen et al., Exp Neurol 148: 135-146, 1997

9 Roy et al., Nature Medicine 6: 271-277, 2000

10 Clarke et al., Science 288: 1660-1663, 2000

11 Tropepe et al., Science 287: 2032-2036, 2000

12 Yandava et al., PNAS 96: 7029-7034, 1999

13 Galli et al., Nature Neuroscience 3: 986-991, 2000

14 Huss et al., Stem Cells 18: 252-260, 2000

Una via alternativa per ottenere cellule staminali è il loro isolamento dal cordone ombelicale successivamente al parto (tabella 7). Le cellule del cordone ombelicale possono essere più vantaggiosamente impiegate in sostituzione delle cellule prelevate da sangue midollare e periferico di adulto grazie alla loro caratteristica di non essere completamente mature dal punto di vista immunologico e all'elevato potenziale di ripopolamento midollare ed immunologico. Al 1998 sono stati eseguiti nel mondo 17800 trapianti di cellule da cordone ombelicale.

Sia le cellule staminali adulte che quelle isolate dal cordone ombelicale sono purtroppo di difficile reperibilità, essendo numericamente molto scarse, ed hanno mostrato grosse difficoltà ad essere coltivate a lungo poiché, dopo alcune divisioni cellulari, tendono a perdere le caratteristiche di pluripotenzialità. Diversamente, le cellule ES possono essere mantenute in coltura per moltissimi cicli di divisione, addirittura per

più di dieci anni, senza perdere la pluripotenzialità. Le cellule ES sembrano costituire il modello staminale più promettente per ottenere i diversi tipi cellulari adatti a curare malattie croniche e degenerative. Cio' nonostante, una grave limitazione all'impiego di questo tipo cellulare deriva dall'incompatibilità immunologica tra i derivati cellulari e tissutali delle cellule ES e l'individuo nel quale questi verranno trapiantati.

Una promettente strategia in grado di risolvere questo problema di immuno-compatibilità si è sviluppata negli ultimi tre anni a partire da studi sulla reversibilità del differenziamento. In particolare i risultati derivanti dagli esperimenti di trasferimento nucleare hanno dimostrato la possibilità di ottenere cellule ES con il patrimonio genetico dell'individuo donatore del nucleo e quindi le cellule ed i tessuti differenziati possono essere trapiantati senza pericolo di rigetto.

Tabella 7. Potenzialità differenziative delle cellule staminali da cordone ombelicale

Stem cell type isolated	In vitro expansion	Organism	Differentiation in vivo / in vitro	Cell type obtained	
Endothelial precursors	Yes (14 d)	Human	in vivo (rat)	Endothelial network (therapeutic vasculogenesis)	1
Mononuclear	No	Human	in vivo (mouse)	Myelocytic, erythroid, megacaryocytic, multilineage colonies	2
CD34 ⁺	Yes (15 d)	Human	in vivo (mouse)	Hematopoietic	3
CD34 ⁺	Yes	Human	in vitro	Myeloid, B-lymphoid lineages	4
CD34 ⁺ progenitors	Yes	Human	in vitro	Langerhans-like dendritic cells	5
Mononuclear	Yes	Human	in vitro	Mesenchymal progenitors	6

1 Murohara et al., J. Clin. Investig. 105: 1527-1536, 2000

2 Ueda et al., Stem Cells 18: 204-213, 2000

3 Wilpshaar et al., Blood 96: 2100-2107, 2000

4 Yoshikawa et al., Hum. Immunol. 60: 75-82, 1999

5 Noirey et al., J. Allergy Clin. Immunol. 105: 1194-1201, 2000

6 Erices et al., Br. J. Haematol. 109: 235-242, 2000

Questo approccio necessita ancora dell'impiego di oociti, con ciò incontrando problemi di natura etica legati all'impiego e alla donazione di gameti e problemi legati alla salute della donna donatrice di oociti.

In questa prospettiva è quindi prioritario il proseguimento della ricerca di base dei meccanismi che sottendono ai fenomeni di

de-programmazione e ri-programmazione del genoma su modelli animali, cercando poi di riproporli *in vitro*, in assenza quindi del gamete femminile.

REVERSIBILITA' DEL PROGRAMMA DIFFERENZIATIVO

A partire dal 1997 sono stati pubblicati i risultati di alcune ricerche che dimostrano come il programma genetico di nuclei di cellule terminalmente differenziate possa essere modificato fino ad una sua completa riprogrammazione (11-18). Questi esperimenti, per la cui dettagliata analisi rimandiamo ad un nostro articolo pubblicato su *Le Scienze* (19), hanno impiegato tecniche di trasferimento nucleare. Willmut e Campbell, impiegando come modello animale la pecora (11) e successivamente ricerche alle quali ha partecipato anche il nostro gruppo (12) con il topo, hanno stabilito con chiarezza che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, acquisisce un nuovo programma genetico ed è in grado di iniziare lo sviluppo embrionale terminando con la 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 e quindi possiamo definirlo un clone genetico.

Rimangono oscuri quali siano i meccanismi e le molecole coinvolte in questo processo di deprogrammazione e riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento nell'oplasma.

FATTORI IMPORTANTI PER LA RIPROGRAMMAZIONE DEL GENOMA DEL NUCLEO TRASFERITO

Quali sono i meccanismi molecolari ad oggi conosciuti in grado di regolare l'espressione del genoma negli embrioni preimpianto di Mammifero?

Sebbene nella maggior parte delle cellule il contenuto in DNA e le sequenze del DNA rimangano invariate col procedere dello sviluppo embrionale, il repertorio di geni che viene espresso in un dato tipo cellulare e in

un dato momento del ciclo cellulare è limitato e specifico del tipo cellulare. L'espressione del genoma embrionale viene regolata e limitata da una serie di meccanismi di tipo epigenetico che vengono definiti durante la gametogenesi e le prime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto. E' quindi soprattutto su queste fasi che deve concentrarsi l'attività di ricerca. La metilazione del DNA, l'acetilazione delle proteine istoniche, l'organizzazione della cromatina e l'architettura nucleare sono meccanismi epigenetici coinvolti nel modellare e modulare le funzioni del genoma. Cambiamenti in uno o più di questi regolatori epigenetici determinano modificazioni nell'espressione genica.

Un aspetto importante che ci aiuta nel definire i tempi in cui avvengono le modificazioni delle funzioni del genoma della cellula somatica, successivamente al suo trasferimento nella cellula uovo a contatto del citoplasma, riguarda le modalità ed 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 presenti nel citoplasma dell'oocita e prodotti durante l'oogenesi. mRNA e proteine materne si esauriscono col procedere dello sviluppo embrionale mentre parallelamente inizia la sintesi di mRNA da parte dell'embrione. L'attivazione del genoma embrionale (ZGA, Zygotic Genome Activation) avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle diverse specie di Mammifero (20-29). Nel topo lo 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. Il numero di proteine neo-sintetizzate nell'embrione di topo è circa quaranta, sebbene il numero di trascritti ad oggi identificati sia di molto inferiore e corrisponda solo ad una manciata di geni. Se allo stadio di 2 cellule l'embrione di topo non esprime correttamente i geni embrionali non potrà proseguire nello sviluppo (8, 23, 24, 30). Per questo motivo, l'embrione di topo, ottenuto con il trasferimento di un nucleo somatico, deve

avere il nuovo programma genetico adatto allo sviluppo dell'embrione già pronto allo stadio di 2 cellule. Quindi, meccanismi e molecole coinvolti nel processo di de-differenziazione e riprogrammazione del genoma devono essere studiati nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, nel momento in cui avvengono.

Questi studi permetteranno di comprendere i meccanismi che intervengono nel differenziamento cellulare e nei processi che lo rendono reversibile, aprendo così non solo vasti scenari di conoscenza, ma ancor più enormi possibilità applicative in ambito biomedico e farmacologico. Ciò permetterà di ottenere *in vitro* la de-differenziazione di una cellula somatica prelevata da un individuo adulto e poi di guidarne la re-differenziazione per ottenere un tipo cellulare nuovo in grande quantità, ritrasferibile nel corpo dell'individuo, oppure coltivabile fino

all'ottenimento di una popolazione omogenea e potenzialmente in grado di progredire nelle fasi successive dell'istogenesi e dell'organogenesi. O ancora, la possibilità di indurre cellule quiescenti a riacquisire funzioni utili in un organismo differenziato o di modificare i meccanismi della progressione neoplastica fino alla completa reversione del tumore ed alla riprogrammazione delle attività normali della cellula.

Diversi gruppi di ricerca italiani hanno contribuito enormemente allo sviluppo delle conoscenze in questo settore. Si rende quindi necessario per il nostro Paese una politica di investimenti per mantenere quel residuo margine di vantaggio che il nostro Paese ha ancora sugli altri ma che va rapidamente diminuendo in assenza di iniziative istituzionali appropriate.

BIBLIOGRAFIA

1. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100: 143-156, 2000.
2. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100: 157-168, 2000.
3. Science special issue vol. 287, 2000.
4. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 113: 5-10, 2000.
5. Kikyo N, Wolffe N. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *J Cell Sci* 113: 11-20, 2000.
6. Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karam K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285: 754-756, 1999.
7. Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod Fertil Dev.* 10: 1-17, 1998.
8. Thompson EM, Legouy E, Renard JP. Mouse embryos do not wait for the MBT: chromatin and RNA polymerase remodeling in genome activation at the onset of development. *Dev Genet.* 22: 31-42, 1998.
9. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18: 399-404, 2000.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999.
11. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813, 1997.
12. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374, 1998.
13. Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22:127-128, 1999.
14. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282: 2095-2098, 1998.
15. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction* 60: 996-1005, 1999.
16. Campbell K. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1: 3-15, 1999.
17. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 990-995, 2000.
18. Wakayama T, Tateno H, Mombaerts P, Yanagimachi R. Nuclear transfer into mouse zygotes. *Nature Genetics* 24: 108-109, 2000.
19. Garagna S, Redi CA, Zuccotti M. Storia e tecniche della clonazione. *Le Scienze*, 377: 46-52, 2000.
20. Ko, M. S. H., Kitchen, J. R., Wang, Xiaohong, Threat, T. A., Wang, Xueqian, Hasegawa, A., Sun, T., Grahovac, M. J., Kargul, G. J., Lim, M. K., Cui, Y.-S., Sano, Y., Tanaka, T., Liang, Y., Mason, S., Paonessa, P. D., Sauls, A. D., DePalma, G. E., Sharara, R., Rowe, L. B., Eppig, J., Morrell, C. and Doi, H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development* 127: 1737-1749, 2000.
21. Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* 112: 921-932, 1991.
22. Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 15: 531-538, 1993.
23. Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 270: 22077-22080, 1995.
24. Christians E, Champion E, Thompson EM, Renard JP. Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development* 121: 113-122, 1995.
25. Latham KE, Rambhatla L, Hayashizaki Y, Chapman VM. Stage-specific induction and regulation by genomic imprinting of the mouse U2afbp-rs gene during preimplantation development. *Developmental Biology* 168: 670-676, 1995.
26. Davis W Jr, De Sousa PA, Schultz RM. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Develop. Biol.* 174: 190-201, 1996.
27. Sprinks MT, Sellens MH, Dealtry GB, Fernandez N. Preimplantation mouse embryos express Mhc class I genes before the first cleavage division. *Immunogenetics* 38: 35-40, 1993.
28. Kay GF, Barton SC, Surani MA, Rastan S. Imprinting and X chromosome counting mechanisms determine Xist expression in early mouse development. *Cell* 77: 639-650, 1994.
29. Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A. Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 814-817, 1993.
30. Thompson EM. Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. *Reprod Nutr Dev.* 36: 619-635, 1996.

SILVIA GARAGNA

Laureata in Scienze Biologiche nel 1980 a Pavia, è ricercatrice presso la Facoltà di Sc. MM.FF.NN della stessa Università dove svolge il corso di Biologia dello Sviluppo per Scienze Biologiche. Si occupa dello studio dei processi gametogenetici sia maschili che femminili e delle prime fasi dello sviluppo in diversi modelli animali, in particolare nei Mammiferi, anche in presenza di riarrangiamenti strutturali del cariotipo. Questo tipo di ricerche è inserito nella cornice concettuale di studi di tipo evolutivo, valutando su popolazioni naturali di roditori le influenze del cariotipo sui fenomeni di microspeciazione. Nell'ambito di collaborazioni internazionali ha soggiornato presso le Université di Wurzburg (Germania) di Oxford e di York (Gran Bretagna). Ha ricevuto un finanziamento dalla Fondazione Telethon per lo studio del differenziamento cellulare in embrioni ottenuti da trasferimento nucleare.

Contatti:

Università - Dip. Biologia Animale Lab. Biologia dello Sviluppo Piazza Botta 9 27100 Pavia
tel 0382.506323 fax 0382.506270 E-mail garagna@unipv.it

CARLO ALBERTO REDI

Laureato in Scienze Biologiche nel 1972 a Pavia, è Professore Ordinario di Zoologia presso la Facoltà di Scienze MM.FF.NN. dell'Università di Pavia. Si è occupato di citochimica del DNA e della valutazione delle aneuploidie gametiche con metodiche citochimiche e citogenetiche, temi approfonditi con soggiorni al Sylvius Laboratories di Leiden (Olanda) e presso le Università di Lubeca e Dusseldorf (Germania). Lo studio dello sviluppo e della differenziazione delle cellule germinali in diversi modelli animali di variabilità cariotipica, ed il loro impiego per saggi di ecotossicologia, è il tema di ricerca attuale.

Contatti:

Università - Dip. Biologia Animale Lab. Biologia dello Sviluppo Piazza Botta 9 27100 Pavia
tel 0382.506306 fax 0382.506323 E-mail redi@unipv.it

MAURIZIO ZUCCOTTI

Laureato in Scienze Biologiche nel 1986 a Pavia, è Professore Associato di Istologia ed Embriologia presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Parma. Ha svolto ricerche sia presso laboratori di Università italiane e straniere. In Italia ha lavorato a lungo con il laboratorio di Biologia dello Sviluppo dell'Università di Pavia. Per sei anni ha lavorato in Università straniere: presso il laboratorio del Prof. Ryuzo Yanagimachi alla University of Hawaii (Honolulu, USA), dove si è occupato di biologia della riproduzione nei Mammiferi e ha dimostrato con i suoi colleghi la possibilità di riprogrammare il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate di Mammifero attraverso il trasferimento di nuclei somatici in oociti enucleati; e presso la Molecular Embryology Unit diretta dalla Prof. Marilyn Monk alla University College of London (London, UK) dove ha studiato i meccanismi molecolari (in particolare l'imprinting del genoma) che regolano lo sviluppo dell'embrione preimpianto di Mammifero. E' coordinatore di un progetto di ricerca finanziato dalla Fondazione Telethon per lo studio del differenziamento cellulare in embrioni ottenuti da trasferimento nucleare.

Contatti:

Università - Dip. Medicina Sperim. Sez. Istologia ed Embriologia Via Volturmo 39 43100 Parma
tel 0521.903911 fax 0521.903912 E-mail maurizio.zuccotti@unipv.it