



**scienza attiva<sup>®</sup>**

**Tecnologie per lo studio**

**delle cellule staminali**

**Dr.ssa Annalisa Buffo**

**Università degli Studi di Torino**

**Dipartimento di Neuroscienze**

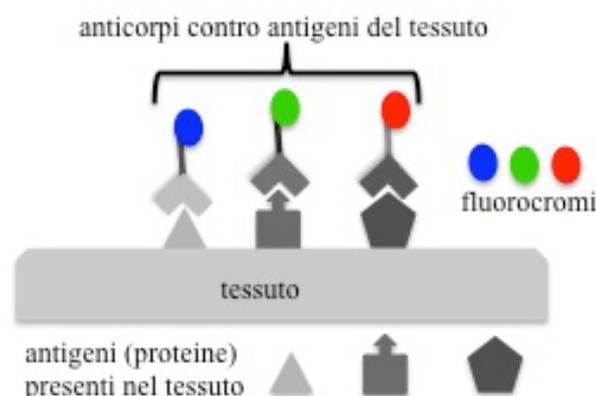
## Introduzione: come smascherare le cellule staminali

Le cellule staminali sono tanto affascinanti quanto sfuggenti. Per studiarle, i ricercatori hanno inizialmente utilizzato metodiche tradizionali ma si sono presto resi conto di doverle adattare e innovare per le specifiche necessità di questo nuovo argomento di ricerca. Questo processo di innovazione tecnologica e metodologica continua tuttora e contribuisce a rendere molto dinamico questo settore della ricerca. Il modello di ricerca d'elezione è costituito da animali di laboratorio (in prevalenza topi), ma quando possibile sono esaminati anche campioni umani.

Il nodo cruciale da sciogliere per dimostrare l'esistenza di cellule staminali in un tessuto e svelarne i segreti è l'identificazione del tipo cellulare con proprietà staminali. Infatti, non è semplice distinguere gli elementi capaci di auto-rinnovamento e pluri/multipotenza all'interno di un tessuto complesso e, in alcuni casi, tra molte cellule di forma simile e talvolta proliferanti. Per raggiungere questo scopo i ricercatori associano tecniche classiche di analisi morfologica e istologica ad approcci più innovativi, basati su tecnologie biomolecolari che permettono di isolare le cellule dal tessuto, studiarne il comportamento in contesti diversi da quello nativo, seguirne la progenie nel corso del tempo o modificarne l'espressione genica. Qui di seguito, descriverò alcune metodiche utilizzate per lo studio delle cellule staminali neurali. Queste tecnologie sono impiegate anche nello studio di altre tipologie di staminali.

## Analisi morfologiche e istologiche delle zone neurogeniche

Una prima necessità nello studio cellule staminali è localizzarle, capirne la forma e le caratteristiche molecolari in modo da distinguerle dalle altre cellule, progenitori unipotenti o elementi completamente maturi. Quest'obiettivo è perseguibile con l'analisi istologica di campioni trattati in modo da garantirne una corretta conservazione. Molto utili a questo scopo sono le tecniche di colorazione di cellule e tessuti basate su anticorpi che riconoscono specifiche molecole (antigeni, per lo più proteine) e sono a loro volta legati a molecole fluorescenti (fluorocromi) o a enzimi capaci di produrre precipitati colorati. Queste tecniche si chiamano rispettivamente immunofluorescenza e immunohistochimica. I fluorocromi e i precipitati colorati sono visibili al microscopio (ottico, a epifluorescenza e confocale) quando illuminati da fonti luminose appropriate.



Secondo le procedure di immunofluorescenza, specifiche molecole (antigeni) del tessuto in esame sono

riconosciute da anticorpi coniugati a molecole fluorescenti (fluorocromi). I diversi colori ne permettono la visualizzazione nel tessuto.

Per identificare le staminali se ne può sfruttare la capacità proliferativa: la presenza nelle cellule di macchinari molecolari attivi durante la divisione può essere rivelata applicando sul campione da esaminare anticorpi specifici secondo il metodo sopra descritto. Tuttavia, mentre questo metodo funziona bene durante lo sviluppo, nell'organismo adulto le cellule staminali si dividono più raramente e lentamente degli altri progenitori. Diventa quindi improbabile riuscire a osservare i macchinari della divisione. Un'alternativa utile per ovviare a questo problema è la possibilità di inserire nel DNA in duplicazione delle cellule prima della mitosi una molecola particolare chiamata *bromodesossiuridina*. Questa molecola è simile alle basi azotate che compongono il DNA ed è a sua volta visualizzabile con appositi anticorpi. Le cellule in coltura o nell'animale vivo possono essere esposte anche per lungo tempo alla *bromodesossiuridina* in modo da non perdere quel raro momento in cui i progenitori staminali attivando il processo di divisione duplicano il proprio DNA. Inoltre, la *bromodesossiuridina* rimane stabilmente inserita nel DNA cellulare anche dopo la fine della divisione, permettendo quindi di individuare nel tempo cellule che si sono moltiplicate e di seguirne il differenziamento.

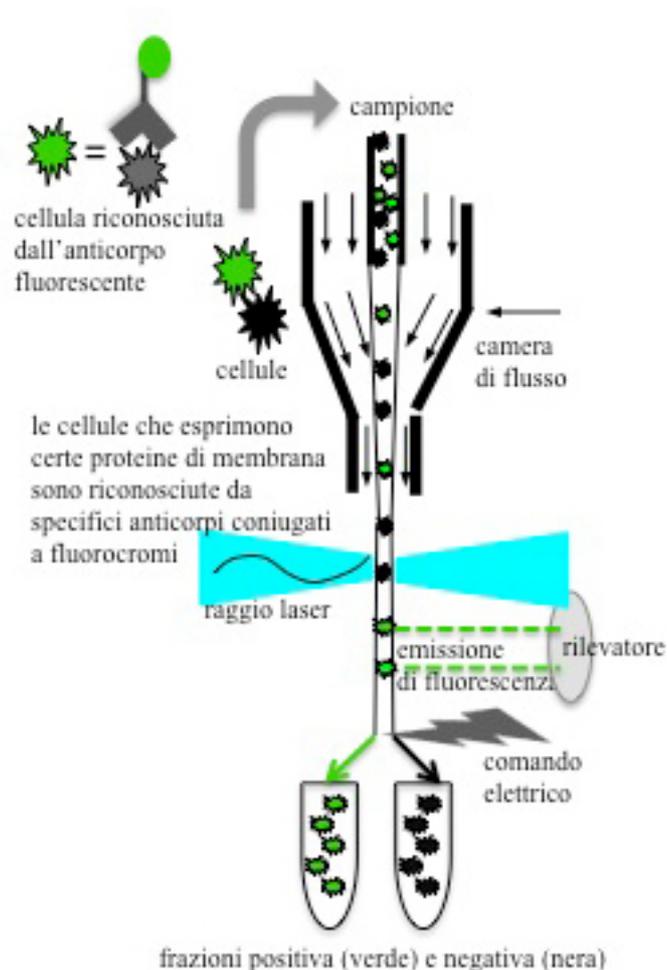
L'attività proliferativa è solo uno degli indizi utili per 'dare un volto' alle cellule staminali: per disegnare il loro identikit (fenotipo) i ricercatori cercano proteine o molecole che vi siano espresse. L'analisi di marcatori proliferativi è quindi associata a quella di altre molecole grazie alle tecniche di immunofluorescenza. Altri particolari sulla morfologia e struttura delle cellule staminali possono essere ottenuti con studi di microscopia elettronica: il campione viene esplorato da un fascio di elettroni in sostituzione del fascio di luce usato nella microscopia ottica convenzionale. Quest'analisi offre informazioni molto precise sulle relazioni reciproche tra le cellule e sulla loro ultrastruttura (caratteristiche subcellulari come la presenza di certi organelli dentro la cellula). Per esempio, quest'analisi ha permesso di dimostrare che le cellule staminali neurali adulte condividono molte caratteristiche con gli astrociti, cellule che offrono supporto trofico e metabolico ai neuroni e sono distribuite in tutto il tessuto nervoso.

Per dimostrare che l'identikit delineato dalle analisi della proliferazione e d'espressione è quello corretto, sono necessarie analisi funzionali che confermino che le cellule di cui si sospetta agiscano davvero come elementi staminali. Per questi scopi si possono usare diversi approcci sperimentali che includono tecniche di selezione dal tessuto (*ex vivo*) di cellule candidate a essere staminali, saggi di funzionamento in provetta (colture cellulari in vitro o in colture d'organo *ex vivo*) e analisi del tessuto nervoso (*in vivo*), anche ottenuto da topi transgenici nei quali le cellule staminali esprimono costitutivamente una proteina fluorescente. Al momento non esiste nessuna molecola che, essendo espressa in maniera esclusiva dalle cellule staminali neurali, permetta di riconoscerle senza ambiguità. Mentre la ricerca continua, ci si basa sull'espressione di combinazioni di varie molecole e rimangono indispensabili i saggi funzionali.

## **Tecniche di selezione**

Una delle tecniche più innovative impiegate per isolare le presunte staminali e studiarne il funzionamento è la selezione basata sull'espressione di particolari molecole (soprattutto proteine) presenti sulla superficie delle cellule. Le cellule così selezionate possono essere testate in saggi che ne rivelino il comportamento staminale (vedi sotto), trapiantate (vedi sotto) o studiate sotto il profilo dell'espressione genica al fine di capire quali geni sono specificamente attivi nelle cellule staminali.

Per la selezione, il tessuto (o le cellule in coltura) sono dissociate a formare una sospensione di singoli elementi esposti successivamente al legame con anticorpi coniugati con dei fluorocromi. Gli anticorpi sono capaci di riconoscere le molecole di membrana d'interesse. Le cellule così marcate da 'bandierine' anticorpali colorate vengono analizzate da uno strumento chiamato Fluorescence Activated Cell Sorter (FACSorter, selezionatore cellulare attivato dalla fluorescenza). Nell'apparecchiatura le cellule viaggiano sospese in un fluido in fila indiana sotto il controllo di un dispositivo elettronico. Lo strumento, illuminando le singole cellule con uno o più raggi luminosi prodotti da laser, rileva la fluorescenza che esse restituiscono e sfrutta questo segnale per misurare diversi parametri cellulari come dimensione, forma e complessità. Inoltre, le cellule positive per il segnale fluorescente – e quindi esprimenti la o le molecole d'interesse-, sono indirizzate a fluire in direzione diversa dalle cellule negative. In questo modo, frazioni di cellule positive e negative per un certo segnale fluorescente vengono raccolte vive in contenitori separati e usate poi per altri esperimenti. In alcuni casi, valendosi della tecnologia del DNA ricombinante e della possibilità di generare animali da laboratorio in cui una molecola fluorescente è espressa nelle cellule staminali, la selezione avviene immediatamente dopo la dissociazione, senza bisogno di alcuna incubazione con anticorpi.



Procedura di selezione mediante Fluorescence Activated Cell Sorting

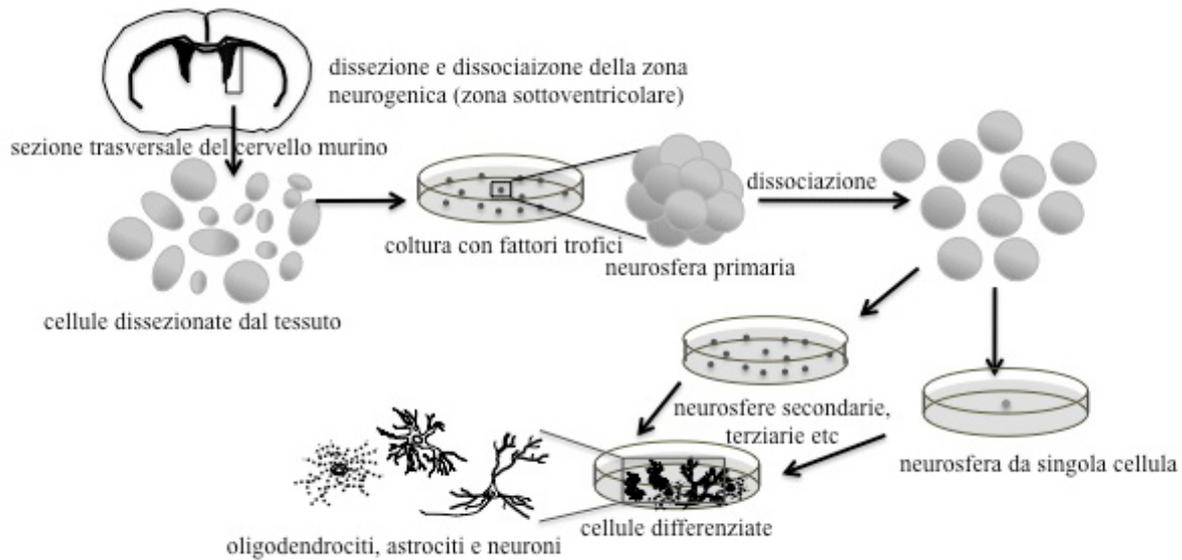
Come alternativa alla selezione basata sull'espressione di bandierine "fluorescenti", le cellule dissociate possono essere selezionate con anticorpi coniugati a microscopiche biglie magnetiche (magnetic-activated cell sorting, MACs, selezione cellulare mediata da magneti). Le cellule legate dagli anticorpi sono trattenute da apposite colonnine magnetiche mentre tutte le altre sono raccolte separatamente. Le cellule trattenute dalla colonna sono poi eluite (staccate) con un liquido speciale, vive e pronte per successivi esperimenti.

## Saggio di formazione delle neurosfere

Il saggio di formazione delle neurosfere, come anticipato nel Focus di Luca Bonfanti, è uno strumento utile per dimostrare l'esistenza nel tessuto di elementi dotati delle due proprietà caratteristiche delle cellule staminali: l'auto-rinnovamento e la multipotenzialità. Consiste nell'esposizione di cellule direttamente dissociate dal tessuto o selezionate come descritto in precedenza a fattori trofici che ne stimolano la proliferazione. Questa procedura rivela la presenza di elementi responsivi ai fattori trofici e allo stesso tempo elimina tutte le cellule completamente differenziate che non sopravvivono in questo saggio. Le cellule staminali, invece, proliferano intensamente e generano dei gruppetti sferici di cellule (neurosfere) che rimangono in sospensione nel mezzo di coltura. Con il passare del tempo le sfere s'ingrandiscono e assumono una composizione eterogenea, che include anche elementi indirizzati ormai verso la maturazione. La capacità di produrre nuove neurosfere dopo una dissociazione è caratteristica delle neurosfere che contengono elementi staminali. Se nel corso di almeno sei passaggi di successiva dissociazione e amplificazione per proliferazione si ottengono nuove neurosfere si può concludere che il tessuto di partenza conteneva cellule capaci di auto-rinnovamento. Questo saggio può essere eseguito anche in maniera 'clonale', separando in colture distinte le singole cellule e quindi ottenendo neurosfere derivate con certezza da una singola cellula ben identificabile. Anche i progenitori con limitata capacità di auto-rinnovamento e non multipotenti possono in realtà produrre neurosfere, ma queste non si ingrandiscono molto in coltura e contengono cellule che, dopo una prima dissociazione, non sono in grado di produrre altre neurosfere.

Per attribuire proprietà staminali alle cellule, occorre anche dimostrarne la multipotenza. A questo scopo si pongono le neurosfere intere o dissociate come singole cellule in una coltura senza fattori trofici che stimoli il differenziamento. In queste condizioni, le cellule maturano nei tre tipi neurali (neuroni, oligodendrociti e astrociti), mostrando la propria multipotenzialità. E' interessante notare che le neurosfere prodotte da semplici progenitori si differenziano producendo una sola tipologia cellulare o al più astrociti e oligodendrociti insieme (gliosfere). Non sono quindi multipotenti.

In questo saggio 'in provetta' (in vitro) possono essere applicati dei trattamenti farmacologici o delle manipolazioni biotecnologiche per capire come certe sostanze o meccanismi molecolari influenzano il comportamento delle cellule staminali. Tuttavia, il saggio delle neurosfere, molto utile per rivelare la presenza di elementi staminali e per ottenere grandi quantità di cellule indifferenziate a scopo di trapianto o di studio dell'espressione genica, presenta alcuni limiti. Innanzi tutto, le cellule staminali in vitro differenziandosi producono prevalentemente cellule gliali (molti astrociti e una frazione di oligodendrociti) e pochi neuroni. Al contrario, in vivo esse producono prevalentemente neuroni. E' chiaro, quindi, che il comportamento delle cellule staminali in vitro non corrisponde direttamente a quello in vivo e che la nicchia ambientale tridimensionale nella quale le staminali risiedono nel tessuto è essenziale per il loro corretto funzionamento. Dunque, i risultati ottenuti con questo saggio possono fornire indizi importanti sul funzionamento delle cellule staminali ma necessitano di conferme ottenute direttamente nell'organismo vivente (*in vivo*). Altri limiti sono costituiti dall'impossibilità per i fattori contenuti nel mezzo di coltura di raggiungere con la stessa facilità le cellule sulla superficie e al centro delle neurosfere e dalla difficoltà di visualizzare il comportamento delle cellule nella profondità della sfera. Per ovviare a ciò si possono depositare e crescere le cellule in adesione su superfici trattate o in gel soffici. In questo caso, il corrispettivo delle neurosfere è costituito da grappuscoli di cellule in forma di cloni. Altre metodiche impiegate per crescere in coltura cellule staminali embrionali e fetali in adesione sono descritte nel Focus di Luciano Conti.



Rappresentazione schematica del saggio di formazione delle Neurosfere

### Fettine organotipiche ed espianti

Il corretto funzionamento delle cellule staminali è strettamente legato all'ambiente tridimensionale del tessuto (nicchia staminale), e a precise relazioni con le cellule adiacenti e con le molecole presenti nello spazio extracellulare (matrice). Per preservare questa struttura per quanto possibile usando però un modello sperimentale più facile da manipolare e da ispezionare del sistema nervoso *in vivo*, si è trovato il modo di crescere 'fuori' dal sistema nervoso (*ex vivo*) per tempi definiti dei pezzetti o delle sezioni di tessuto contenenti le cellule staminali e la loro progenie (*colture d'organo*).

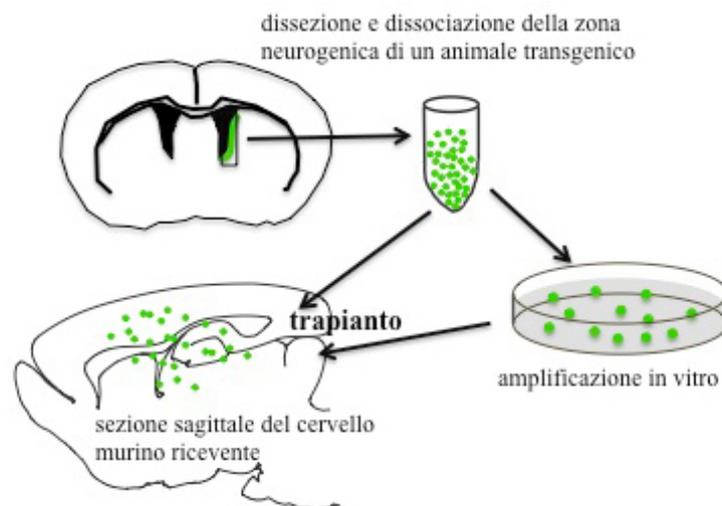
Fettine (*fettine organotipiche*) o pezzetti (*espianti*) di cervello possono essere prelevati dal sistema nervoso durante lo sviluppo embrionale o nel primo periodo dopo la nascita. Essi sono mantenuti in coltura su membrane porose che permettono l'assorbimento di nutrienti e ossigeno dal sottostante mezzo di coltura e dal sottile film liquido che per capillarità ricopre totalmente il tessuto dissezionato. In queste condizioni può essere testato l'effetto di alcune sostanze o di specifiche manipolazioni geniche sul comportamento delle cellule staminali e dei loro derivati. Possono inoltre essere trapiantate cellule esogene o applicate delle lesioni chimiche o meccaniche. I risultati di tali manipolazioni sono valutati con procedure istologiche e colorazioni immunofluorescenti dopo aver trattato i campioni con un fissativo che ne impedisce il deterioramento. Il movimento e la divisione delle cellule nelle fettine organotipiche possono anche essere osservati direttamente al microscopio nel corso del tempo su preparati 'vivi' (tecnica del *time-lapse*) quando le cellule d'interesse siano identificabili sulla base della loro forma o dell'espressione di un marcatore fluorescente. Per tempi d'osservazione particolarmente brevi (qualche ora), le fettine di tessuto (chiamate in questo caso *fettine acute*) vengono semplicemente mantenute immerse in un liquido addizionato di ossigeno che ha la composizione del liquido cerebrospinale (il fluido corporeo di cui è imbevuto il sistema nervoso e che si trova nelle sue cavità).

Espianti di zone neurogeniche possono anche essere mantenuti in gel soffici immersi nel mezzo di coltura. Questo metodo è particolarmente utile per seguire la migrazione dei giovani neuroni che escono dall'espianto formando delle piccole catenelle nel gel. Non è però utile per studiare il comportamento delle cellule staminali che dopo breve tempo perdono le proprietà staminali. Questo accade anche per le zone neurogeniche nelle fettine organotipiche. Fettine organotipiche ed espianti sono quindi modelli sperimentali utili per guardare da vicino e per manipolare facilmente le cellule

staminali in azione, ma funzionano bene per questi scopi solo per tempi limitati.

### Trapianti di cellule staminali e progenitori

Il trapianto di cellule staminali, oltre che essere utilizzabile come strumento terapeutico per patologie ben definite (come per le cellule staminali ematopoietiche nelle malattie ematologiche), è un metodo molto efficace per studiare come l'ambiente influenza il funzionamento delle cellule staminali. Cellule staminali o progenitori neurali possono essere ottenuti direttamente dal tessuto nervoso dissezionando e dissociando le aree nelle quali essi si trovano e immediatamente trapiantati o espansi in coltura prima del trapianto intracerebrale. In alcuni casi le cellule da trapiantare vengono inoculate per via endovenosa nell'animale ospite. In genere il trapianto è distinto dal tessuto ospite grazie all'espressione di una proteina fluorescente. L'iniezione delle cellule nel tessuto a diversi stadi di maturazione (embrionale o adulto), in aree diverse (cervello o midollo spinale, zone neurogeniche o non neurogeniche) e in condizioni diverse (cervello sano o danneggiato per esempio da un'ischemia cerebrale) permette di capire qual è la capacità di sopravvivenza, di proliferazione, di differenziamento e integrazione delle cellule nel tessuto ospite nelle diverse condizioni testate. Ad esempio, permette di capire se le cellule trapiantate sono in grado di sostituire popolazioni neuronali o gliali (pensate alla mielina prodotta dagli oligodendrociti che vanno distrutti nella Sclerosi Multipla) perdute e in quali condizioni. I risultati della ricerca in questo ambito sono nel complesso piuttosto deludenti perché al fuori delle zone neurogeniche il tessuto nervoso si è dimostrato restio ad accogliere cellule staminali e progenitori neurali e a permetterne un corretto differenziamento per la sostituzione delle cellule morte. C'è molto lavoro da fare, quindi, per scoprire e neutralizzare i meccanismi che rendono il tessuto nervoso ostile alle cellule staminali/progenitori neurali e per "rafforzare" la sopravvivenza e la capacità di maturazione delle cellule trapiantate.



### Visualizzazione e la manipolazione genica delle cellule staminali

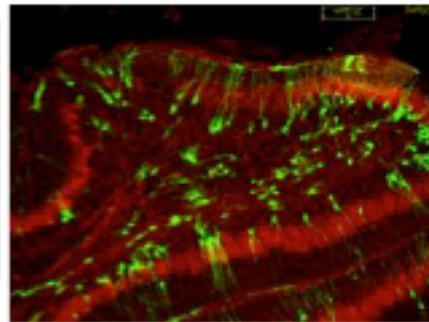
Per soddisfare l'esigenza primaria di 'vedere' le cellule staminali e per modificarne il funzionamento nei tessuti o in coltura sono state ampiamente sfruttate le tecniche di ingegneria genetica. Grazie a queste metodiche è possibile introdurre geni esogeni (non presenti nell'organismo d'interesse) nello zigote (la cellula derivata dalla fusione dei gameti, femminile e maschile) o nelle cellule da esso derivate nei primissimi stadi dell'embriogenesi (*transgenesi*). In questo modo vengono generati animali da laboratorio detti *animali transgenici*. Tra i geni esogeni

possono essere introdotti quelli che permettono la produzione di proteine fluorescenti. Inoltre, la loro espressione può essere vincolata a quella di altre proteine prodotte dall'organismo o dalla cellula d'interesse. Per esempio, la proteina fluorescente può essere associata a proteine 'di riferimento' espresse dalle cellule staminali. Come risultato, nasceranno saranno animali nei quali le cellule staminali sono fluorescenti fintanto che le proteine di riferimento sono espresse, mentre le cellule da esse derivate, non contenendo le proteine d'interesse, saranno negative.

Altri approcci di ingegneria genetica (*mutanti condizionali*) permettono di attivare l'espressione di una molecola fluorescente nelle cellule d'interesse in una specifica fase dello sviluppo o della procedura sperimentale. Tale attivazione ha anche il vantaggio di essere permanente e trasmissibile alle cellule figlie. Di nuovo, l'espressione della molecola colorata è vincolata all'espressione di una specifica proteina 'di riferimento' ma viene accesa solo quando lo sperimentatore lo desidera e somministra all'animale o alla cultura un agente farmacologico specifico. Le cellule d'interesse attiveranno quindi la produzione stabile della molecola fluorescente e ne trasmetteranno l'attivazione alla propria progenie.



Topi trasgenici o mutanti



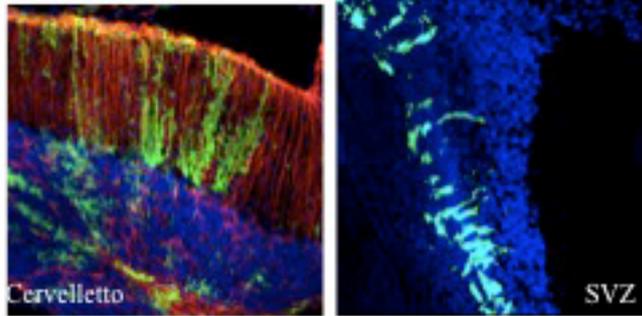
esempi di cellule del cervelletto indotte a esprimere la proteina fluorescente GFP (green fluorescent protein)

Modificazioni di questo tipo possono essere ottenute in un numero ristretto di cellule staminali e progenitori anche grazie all'utilizzo di vettori virali. Particolari virus possono essere ingegnerizzati in modo da perdere la capacità di riprodursi e da veicolare all'interno delle cellule infettate geni esogeni o modificati a scelta dallo sperimentatore, inclusi quelli che codificano molecole fluorescenti. I vettori virali vengono iniettati nelle zone neurogeniche o applicati nel mezzo di coltura. A seconda del tipo particolare di vettore virale, la sequenza genica che esso porta può introdursi stabilmente nel DNA della cellula infettata oppure rimanere nel citoplasma. Se si integra nel genoma, esprimerà la molecola fluorescente per tutta la vita della cellula e genererà cellule che a loro volta ereditano l'espressione della proteina fluorescente. Se l'integrazione non avviene, l'espressione della molecola fluorescente non è permanente né passa in maniera efficiente alla progenie. Inoltre, alcune particelle virali riescono a modificare solo cellule in attiva proliferazione mentre altre possono essere indirizzate a infettare anche cellule poco proliferative come, per esempio, le cellule staminali. L'insieme di queste manipolazioni biotecnologiche permette di studiare il funzionamento delle cellule staminali e della loro progenie nella situazione nativa e a seguito di particolari trattamenti farmacologici.



vettore virale che porta una sequenza genica codificante per una proteina fluorescente

Iniezione nel tessuto



cellule infettate (trasdotte) esprimenti la proteina fluorescente (verde)

I vettori virali vengono altresì impiegati per indurre o spegnere l'espressione di specifiche proteine nelle cellule bersaglio. Questo tipo di manipolazione permette di capire qual è ruolo di un certo macchinario molecolare nel funzionamento dei progenitori staminali neurali e delle cellule che da essi derivano. Sovraespressione o inattivazione di specifiche proteine sono anche ottenute in animali transgenici o mutanti, secondo le procedure della transgenesi classica, condizionale (vedi sopra) o *knock-out* (procedura di rimozione di un certo gene, completa o condizionale).

## Conclusioni

Lo studio delle cellule staminali è un esempio di come la ricerca proceda integrando approcci diversi, molto innovativi ma anche tradizionali, per ottenere una conoscenza in continua evoluzione e aprire nuove prospettive applicative, come quelle terapeutiche nel campo della ricerca clinica.

Sito per consultazione:

<http://learn.genetics.utah.edu/content/tech/stemcells/>