

## Biologia molecolare delle cellule staminali

Lezione del 4/10/22

Il professore chiede cosa sono le cellule staminali e a questa domanda rispondono due ragazzi dicendo che le cellule staminali sono cellule in grado di differenziare in altri tipi di cellule, assumendone tutte le funzionalità e sono anche cellule che possono dare origine ad altre cellule staminali, che quindi si auto-rinnovano.

Queste due risposte date sono parzialmente corrette ma il professore decide di iniziare a spiegare cosa realmente sono partendo invece da cosa NON sono.

(La cellula staminale è una cellula che può dare origine ad una cellula uguale a sé stessa o differenziarsi)

Cosa **NON** sono le cellule staminali: **Non sono cellule differenziate.**

Cos'è una cellula differenziata? È una cellula specializzata ovvero cellula che presenta una struttura definita per essere in grado di svolgere una determinata funzione in base all'organo in cui si trova, ovvero non esprimono geni che permettono la differenziazione verso un lineage specifico.

Ad esempio: neuroni, cellule del muscolo, cellule riproduttive.

(Il secondo concetto introdotto dalla collega è quello dell'auto-rinnovamento delle cellule staminali e per parlarne partiamo da un'introduzione storica.)

Prima di tutto sappiamo che le cellule esistono nei nostri corpi ma sono utilizzate culture esistono anche metodi per coltivare le cellule fuori dall'organismo e per farlo esistono diverse applicazioni.

Tutto nasce verso la fine dell'800 e l'inizio del '900 quando grazie allo studio di tecniche di microscopia e di analisi di preparati microscopici ci si cominciò a chiedere se fosse effettivamente possibile coltivare cellule al di fuori dell'organismo = Esperimenti che cercavano di estrarre cellule da frammenti di tessuto e farle crescere su piastre.

Nel 1912 un cardiologo Alexis Carrel (ha vinto Nobel in medicina) aveva una visione, all'epoca rivoluzionaria, per cui fosse possibile mantenere il tessuto vivo al di fuori di un paziente con lo scopo del trapianto (aveva ipotizzato il trapianto di cuore!) e il primo step fu cercare di capire se fosse possibile mantenere le cellule in vita al di fuori dell'organismo.

Carrel e i suoi collaboratori fecero questo esperimento lavorando con embrioni di pollo prelevando cellule di tessuti cardiaci (fibroblasti cardiaci) dal cuore dell'embrione e trasferendole su piastre petri (mettendole in coltura) nutrendole con estratto da embrioni di pollo stesso, osservò che queste cellule erano a suo dire

IMMORTALI anzi si replicavano costantemente in maniera apparente illimitata. Quello a cui arrivò Carrel fu il concetto per cui le cellule muoiono perché muore l'organismo non ricevendo più nutrimento necessario alla sopravvivenza, ma se voi fornite loro il giusto nutrimento anche al di fuori dell'organismo quelle continueranno a sopravvivere e saranno quindi immortali. Nascono anche cosmetici prodotti con embrioni di pollo. Carrel capì che l'immortalità è una capacità intrinseca delle cellule del cuore di pollo.

[Carrel credeva anche che la luce fosse dannosa alla sopravvivenza cellulare tant'è che gli esperimenti venivano svolti in stanze completamente al buio. Questi esperimenti si concludevano con la sopravvivenza e quindi l'immortalità di queste cellule garantita dal costante nutrimento grazie a questo fluido. Avendo Carrel all'epoca un'importante risonanza nel mondo della scienza in quanto da poco aveva vinto un premio Nobel per la medicina, questi esperimenti furono presi molto in considerazione tanto che nei negozi di cosmetica si iniziarono a vedere in vendita questo fluido di immortalità che altro non era che embrione di pollo.]

Nessuno tuttavia riusciva riprodurre questi esperimenti anche nell'uomo che Carrel portò avanti fino al 1942.

Nel 1950 una donna afroamericana, Henrietta Lacks, scopre di avere un tumore e si dirige nell'ospedale Johns Hopkins a Baltimora, dove viene presa in cura dal ginecologo Howard Jones. L'ospedale in questione fu scelto poiché si trattava dell'unico ospedale in cui si trovava una parte riservata a persone di colore. Howard Jones in quel momento stava studiando questa immortalità cellulare osservando il rapporto tra il tessuto normale della cervice uterina e due tipi di tumore: il carcinoma in situ (non invasivo) e il carcinoma maligno invasivo.

Questo tipo di neoplasia presentava una forma in situ (non invasiva) e una forma maligna (invasiva); e si ipotizzava una relazione tra la forma non invasiva e la successiva forma invasiva cioè che l'invasiva derivasse dall'invasivo. Le donne con il maligno erano operate e quelle con il non invasivo no. La cosa interessante è vedere come loro per rispondere a una domanda pratica dal punto di vista medico abbiano iniziato a lavorare con colture cellulari di cellule sane, del tipo non invasivo e invasivo rendendosi conto che se in ospedale arriva un paziente con un tipo di carcinoma benigno io lo andrò a trattare come se avesse un carcinoma maligno, quindi utilizzo di chirurgia e radio. Ovviamente per verificare ciò si sarebbe dovuto mettere in coltura cellule prelevate da una persona con tumore non invasivo e osservare la loro trasformazione in cellule tumorali maligne, tuttavia fino a quel momento nessuno riusciva a coltivare cellule.

Nel 1951 viene applicata radio ad Henrietta Lacks e viene prelevato tessuto cellulare e trasferito al laboratorio cellulare del Johns Hopkins (senza permesso) dove c'era il capo del laboratorio George Gey che tentava disperatamente di ripetere gli

esperimenti di Carrel con cellule umane.

Il contributo di George Gey e della moglie Margaret Gey è stato fondamentale nel mondo della ricerca introducendo il concetto di sterilizzazione dei materiali utilizzati riducendo al minimo gli eventi di contaminazione batterica che andrebbero ad inficiare sui risultati.

Quando George Gey riceve le cellule di Henrietta Lacks le mette in coltura e osserva che queste sopravvivono, le nomina con le iniziali della paziente HeLa, cellule che ancora vivono e che conosciamo ancora oggi poiché utilizzate tutt'ora nei laboratori di ricerca. Per la prima volta si ottengono così cellule immortali.

Ma perché prima non si riusciva ad ottenerle? Servivano solo le giuste condizioni per avere cellule immortali? Quello che un ricercatore giovane, Leonard Hayflick, scopre è che le cellule hanno un intrinseco limite nella loro capacità di sopravvivere in maniera illimitata proliferando in coltura.

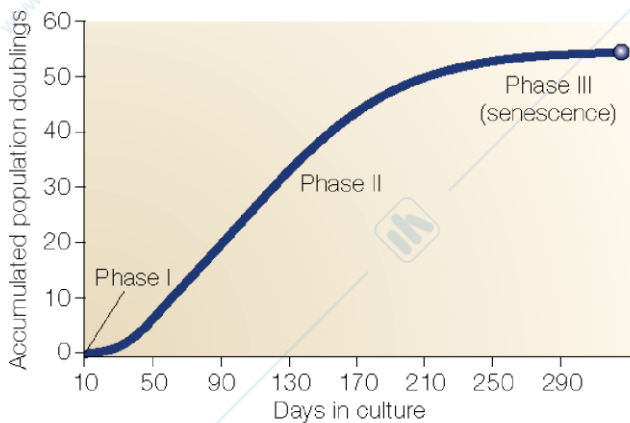
**Limite di Hayflick** (esperimento):

Ha fatto questo esperimento semplicissimo in cui ha preso delle cellule normali (due popolazioni di fibroblasti) da un individuo femmina e da un individuo maschio in modo di poter distinguere l'origine delle singole cellule dal genoma. La differenza era che quelle dall'individuo femmina avevano subito dieci cicli di replicazione prima di essere unite a quelle dell'uomo mentre quelli prelevati dall'individuo maschio ne avevano subito 45. Una volta uniti osservavano che, dopo un certo periodo di tempo, in coltura trovavano solo cellule femmina.

Cosa dimostra? Il numero di replicazione delle cellule in coltura dipende dall'"età" delle cellule: le cellule che hanno subito meno cicli replicativi sono in grado di replicarsi mentre chi ne ha subito tanti non è più in grado. Lui scrive una formula matematica che dimostra tutto questo.

Perché però mischiare insieme le due cellule? Perché ovviamente a quel punto **le condizioni esterne sono le stesse**, ma se soltanto cellule più giovani sono in grado di proliferare allora vuol dire che c'è un meccanismo interno alle cellule che gli impedisce di auto-proliferare. Vuol dire che dipende da caratteristiche intrinseche la capacità di auto-proliferare: le cellule hanno un orologio interno (telomeri) che non è alterato dall'ambiente. E questo oggi è chiamato appunto limite di Hayflick.

Le cellule dopo un po' raggiungeranno quindi un plateau per cui smetteranno di proliferare. Questo dipende sicuramente dai telomeri che durante la replicazione del DNA si accorciano fino al punto da impedire alla cellula di continuare a replicarsi. E le cellule man mano che si riproducono accumulano prodotti cellulari tossici.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Tornando a Carrel, perché le sue cellule risultavano sempre in proliferazione per più di trent'anni e le altre no? Perché il fluido con cui andava ad alimentare le sue colture cellulari conteneva fibroblasti che semplicemente rimpiazzavano i precedenti che nel frattempo avevano smesso di proliferare. Questa è la prima spiegazione che possiamo dare, c'è però una spiegazione molto più semplice ovvero la FRODE SCIENTIFICA. Testimoniata da un giovane ricercatore spedito ai laboratori di

Carrel dal suo capo per scoprire come quest'ultimo riuscisse a mantenere in vita le colture cellulari. Quando alla fine una collaboratrice di Carrel si decide a farlo entrare dichiara che se anche fosse avvenuta contaminazione avrebbe potuto risolvere come sempre andando ad aggiungere altre cellule alla coltura.

Carrel nel frattempo muore e i suoi esperimenti finiscono nel dimenticatoio in quanto appunto solamente frode scientifica.

Facciamo un riassunto di quello che è stato detto fino ad ora, abbiamo detto quindi che esistono **cellule primarie** (normali), come i fibroblasti della pelle, con capacità limitata di autorinnovarsi (replicare) e nemmeno una grande capacità di differenziare. Ci sono **cellule tumorali**, come appunto le cellule HeLa, in cui invece non è rispettato il limite di Hayflick, perché non sono cellule normali ma sono cellule trasformate. Il tumore nasce da un accumulo di mutazioni genetiche che conferiscono immortalità alle cellule stesse con capacità illimitata di replicarsi.

Le cellule normali possono essere convertite in cellule tumorali? Sì e si parla di immortalizzazione di cellule, ma ne parleremo più avanti.

Infine, esistono le **cellule staminali** con capacità di autorinnovamento illimitato non essendo soggette al limite di H pur essendo cellule non trasformate quindi cellule normali. Queste hanno lo stesso genoma dei fibroblasti quindi senza nessuna mutazione genetica.

- Cellule primarie → cellule normali, caratterizzate con capacità di autorinnovarsi limitata e poca/nulla capacità differenziativa. Sono cellule coltivate direttamente da un soggetto.
- Cellule tumorali → cellule trasformate (per aberrazione genetica), illimitata capacità di autorinnovamento, ridotta o assente capacità di differenziamento;
- Cellule immortalizzate → derivanti dalla modificazione delle cellule primarie (espressione di geni propri delle cellule tumorali) → acquisiscono capacità infinita di autorinnovamento ma hanno nulla o ridotta capacità differenziativa.

Perciò prima definizione di **cellule staminali**: cellule con capacità di autorinnovamento illimitata (capacità di dividersi asimmetricamente generando una cellula iso-potenziale e una cellula differenziata ), ma con contestuale capacità di differenziare in una cellula specializzata (maggiore o minore specializzazione in funzione dei processi di differenziamento).

**Autorinnovamento**: dividersi generando almeno una cellula identica a quella di partenza.