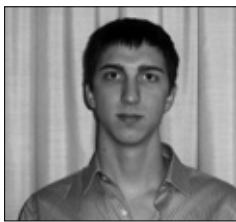


## Biotechnologia applicata

# Individuazione di una popolazione staminale renale: bio-tecniche e bio-tecnologie

D. Lombardi

CdL in Biotechnologie indirizzo medico-diagnostico, Università degli Studi di Firenze, frequentatore del Laboratorio Interdipartimentale di Nefrologia Cellulare e Molecolare diretto dalla dott. P. Romagnani, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Firenze



Duccio Lombardi

### Introduzione

Le cellule staminali sono caratterizzate da proprietà specifiche quali autorigenazione, automantenimento (sono ossia capaci di divisione simmetrica e asimmetrica e presentano una notevole attività telomerasica necessaria al mante-

nimento di un'alta capacità proliferativa) e, com'è ormai ben noto da tempo, presentano multipotenza differenziativa: si definiranno totipotenti quando possono dare origine a tutte le cellule di ogni tessuto (capacità mantenuta dalle cellule embrionali fino al 4°-5° giorno dalla fecondazione), pluripotenti quando possono differenziare in più tipi cellulari di diversi tessuti, e multipotenti quando possono invece dar luogo a tutti i tipi cellulari residenti in un solo tessuto.

Fra le cellule staminali, quelle facenti parte del compartimento embrionale, oltre a mantenere elevati livelli di attività telomerasica esprimono in maniera consistente anche Oct-4, gene codificante un fattore trascrizionale coinvolto nel mantenimento del "self-renewal" e della pluripotenza differenziativa. Tale fattore trascrizionale è spesso usato come marcatore per l'individuazione di cellule non differenziate, mentre l'assenza della sua espressione è intimamente associata alla perdita di tale multipotenza differenziativa.

Le cellule staminali adulte, invece, sono cellule indifferenziate che si trovano in diversi tessuti specializzati, le quali dividendosi danno luogo a cellule progenitrici o precursori, in grado di proliferare e poi differenziare, ma soltanto nei diversi tipi cellulari specializzati del tessuto in cui risiedono. Il loro ruolo primario è ovviamente

quello di mantenere e rigenerare il tessuto. Tali cellule risiedono in nicchie specifiche, protette da insulti ambientali, ove ricevono un notevole apporto ematico che, in caso di necessità, veicolerà i fattori utili a farle entrare nel ciclo cellulare e a farle proliferare, evento che precede il recruitment dalla nicchia staminale in direzione della sede danneggiata.

Da lungo tempo si cercavano anche nel rene cellule che esprimessero caratteristiche funzionali proprie delle cellule staminali di modo da poter spiegare gli eventuali processi rigenerativi causati da insulti di varia natura.

Per identificare tali cellule, si è pensato di utilizzare un approccio teso a verificare la presenza di marcatori di superficie o di fattori trascrizionali tipici dello stato cellulare indifferenziato, associati alla mancanza di altri marcatori o fattori specifici per il lineage. Lo studio che ho scelto di commentare in questa rubrica (1) ha fatto dell'individuazione di specifici markers di superficie la chiave di volta che potesse permettere di definire ed identificare putative cellule staminali nel comparto renale; è stata in particolare ricercata l'espressione dei marcatori CD24, caratteristico delle cellule progenitrici embrionali renali, e CD133, marcatore staminale ampiamente descritto in letteratura (2).

In tale studio (1) è stato inoltre evidenziato che solo le cellule epiteliali parietali (PEC) della capsula di Bowman localizzate in stretta prossimità della giunzione tubulare prossimale del polo urinario, risultano non solo co-esprimere entrambi i marcatori, ma essere anche positive per l'espressione di Oct-4.

Prendendo spunto da questo studio svolto in tessuti renali umani, si cercherà di illustrare in questa rubrica le principali metodologie di carattere biotecnologico che hanno permesso l'individuazione di tali cellule staminali.



## Metodiche

Per ottenere cellule CD24<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup> dal tessuto renale è stata degradata la sola corticale renale proveniente da campioni chirurgici; si sono così isolati i glomeruli grazie ad una serie di passaggi attraverso setacci aventi maglie progressivamente più selettive. I glomeruli sono poi stati piastrati, senza attuare digestioni enzimatiche, al fine di preservare la Capsula di Bowman. Dopo 4-5 giorni di coltura i glomeruli aderiscono alla piastra, evento cui segue, con basse percentuali, un "cellular outgrowth": i glomeruli sono a questo punto asportati e le cellule che hanno aderito alla piastra continuano ad essere coltivate: su queste difatti sarà verificata l'eventuale co-espressione di CD24 e CD133, mediante tecniche citometriche.

La citometria a flusso è una tecnica che ci permette di contare le cellule e di definire parametri di varia natura ad esse associati. Una sospensione cellulare monodispersa è iniettata in un sistema fluidico il quale tende, in opportune condizioni idrodinamiche, a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di intercettazione, dove tale cellula incontra il fascio di luce focalizzata proveniente da un laser. L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula presente nel flusso cellulare genera dei segnali che sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicato-

ri) che ne misurano l'intensità (Fig. 1). I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati che provvede alla loro visualizzazione su monitor, mediante rappresentazione grafica e definizione statistica. Mediante citometria a flusso si possono ottenere misurazioni sui parametri intrinseci della cellula: la quantità di luce trasmessa coassialmente al nostro laser sarà inversamente proporzionale alle dimensioni della cellula (si parla di forward scatter light) (Fig. 2), mentre la quantità di luce riflessa perpendicolarmente alla fonte luminosa (side scatter light) (Fig. 3) sarà direttamente proporzionale alla complessità, o granulosità della cellula. Tale tecnica ci permette di rilevare anche i cosiddetti parametri estrinseci, come la fluorescenza di molecole fluorofore coniugate ad anticorpi che si legano specificamente a molecole espresse sulla superficie cellulare, evento che, nello studio citato, ha permesso di individuare le cellule e CD24<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>.

L'analisi al citofluorimetro prevede una prima fase in cui le singole cellule all'interno di una popolazione mista sono coniugate con anticorpi monoclonali diretti contro antigeni di superficie (nel caso specifico CD24 e CD133). Questi anticorpi primari anti-CD24 e anti-CD133 una volta legati agli antigeni sono rilevati mediante l'uso di anticorpi secondari marcati con molecole fluorescenti e diretti contro gli anticorpi primari. Il preparato è posto in un'apposita provetta posizionata poi sull'apparecchio che

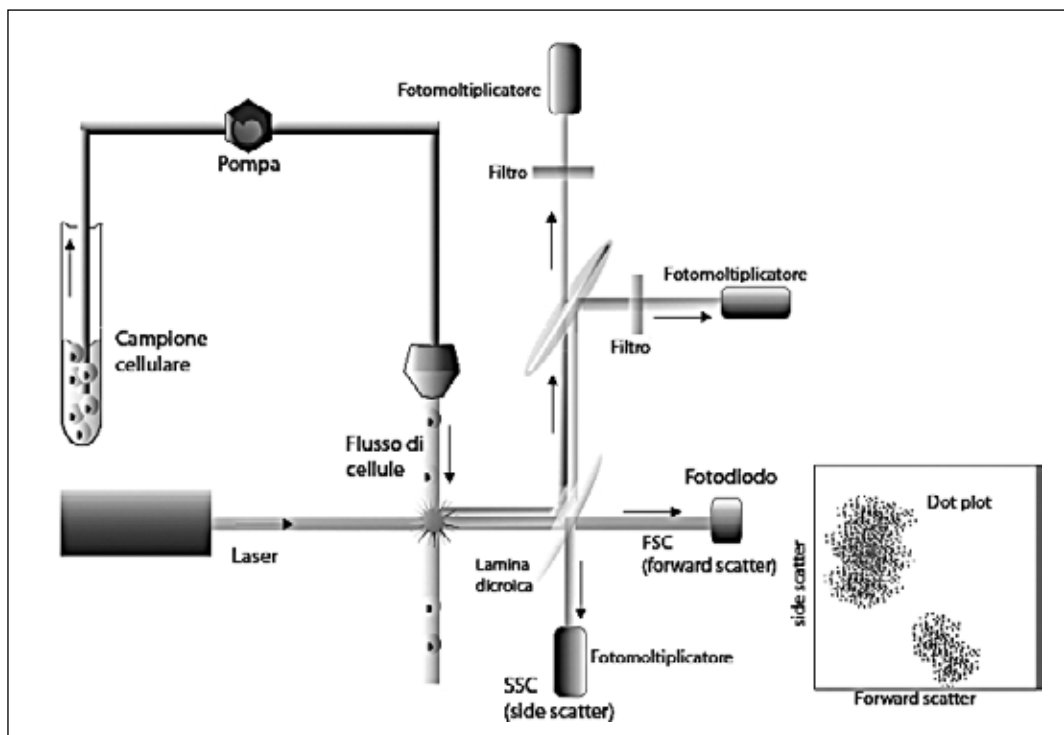
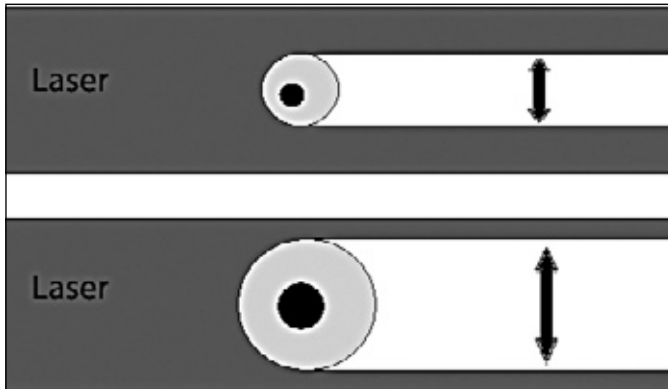


Fig. 1 - Principali componenti di Citofluorimetro.

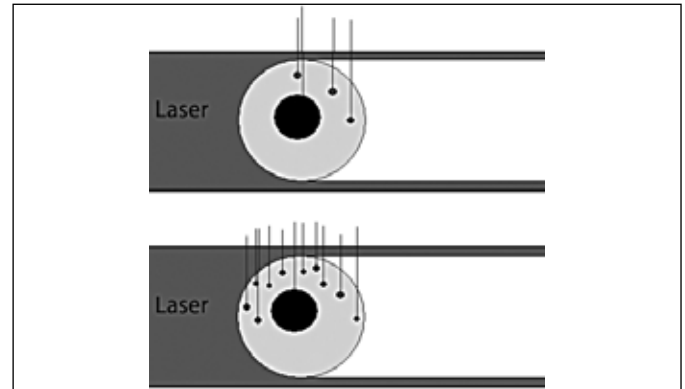


**Fig. 2 - Rappresentazione della misurazione delle dimensioni cellulari per Forward Scatter Light: la luce che riesce ad essere trasmessa coassialmente È inversamente proporzionale alle dimensioni cellulari.**

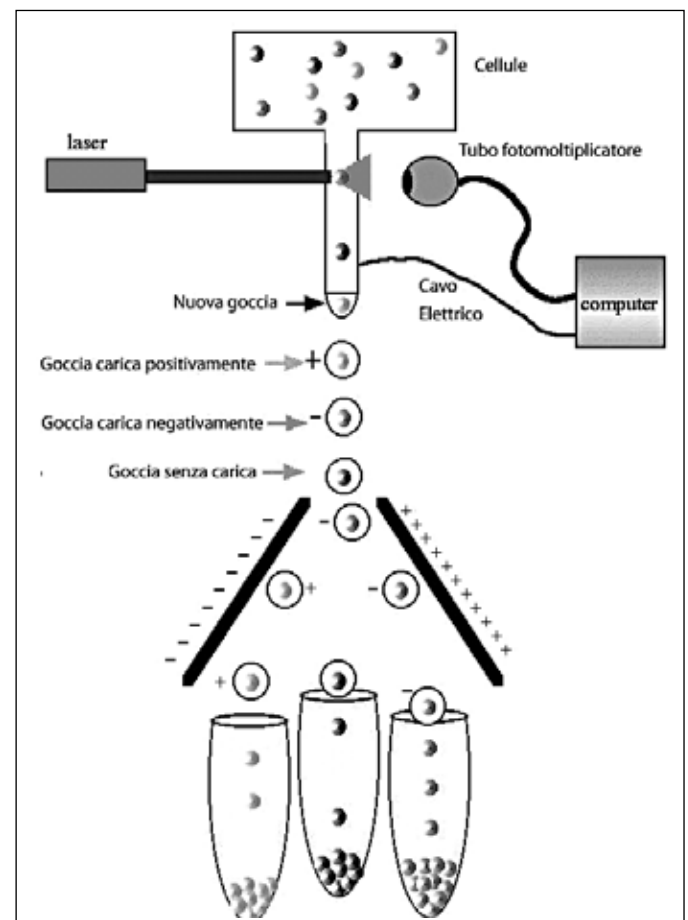
prevede l'uso di un ago per l'aspirazione della soluzione contenente le cellule. Le cellule giungono quindi ad un capillare, ove è creato un flusso continuo monocellulare: a questo punto ogni cellula che attraversa il raggio laser posto lungo tale capillare vede i due diversi fluorofori, quello legato alle Ig anti-CD24, e l'altro a diverso spettro di emissione legato alle Ig anti-CD133, divenire fluorescenti.

Il fatto che in tale studio (1) si sia cercata contemporaneamente la co-espressione di due molecole, mediante l'uso di due fluorofori a diverso spettro di emissione (si rileveranno differenti colorazioni), mette in evidenza che effettivamente si possono usare due o più laser al fine di andare ad eccitare due o più fluorofori diversi, cosa che rende possibile effettuare varie e distinte misurazioni dalle emissioni che risulteranno in seguito all'azione di ogni singolo raggio.

Questa tecnica può anche essere sfruttata per separare determinate popolazioni cellulari esprimenti marcatori di nostro interesse. L'emissione da parte di questi fluorofori, legati individualmente alla cellula, è raccolta dal tubo fotomoltiplicatore (PMT) che genera un segnale elettrico proporzionale all'intensità della fluorescenza rilevata. Questo segnale è trasmesso sotto forma di carica elettrica all'estremità terminale del capillare nel preciso momento in cui quella cellula si troverà a passare da tale zona. Si formerà così una goccia carica, positivamente o negativamente, contenente non più di una singola cellula. Le gocce che hanno carica possono quindi essere deflesse nel passaggio attraverso piastre di cariche opposte: le gocce cariche positivamente si attaccheranno alla piastra carica negativamente, e quelle cariche negativamente alla piastra positiva (Fig. 4). In questo modo si può purificare ed isolare un determinato tipo cellulare da una popolazione cellulare ben più ampia. Il separatore di cellule è chiamato (cell sorter) e il citofluorimetro che lo sfrutta si chiama



**Fig. 3 - Individuazione della granulosità della cellula mediante Side Scatter Light: l'intensità della luce deviata a 90° da complessi intracellulari ci indica la complessità della cellula.**



**Fig. 4 - Schema riassuntivo del funzionamento del cell sorter.**

FACS (fluorescence-activated cell sorter).

Nel caso di uso di due o più anticorpi accoppiati a coloranti diversi i dati sono poi mostrati con diagrammi di



deviazione della luce bidimensionale, o con un diagramma a contorni, dove la fluorescenza di un anticorpo è messa in relazione a quella di un secondo anticorpo, con il risultato che una popolazione di cellule marcata con un anticorpo può essere ulteriormente suddivisa grazie alla colorazione mediante il secondo anticorpo. La morfologia delle cellule immediatamente dopo il sorting può risultare alterata ed è per questo che le cellule saranno poi incubate in vitro al fine di ripristinarne la loro corretta morfologia e al fine di mantenerle vitali.

Le cellule risultanti doppio positive sono poi utilizzate per il clonaggio mediante limiting dilution: si crea ossia una soluzione cellulare così diluita da permetterci l'isolamento di una singola cellula, la quale poi inizierà a crescere e a dividersi dando luogo al suo clone, su cui sarà poi possibile effettuare ulteriori studi.

La separazione mediante cell sorter è scelta prevalentemente quando si intende separare le cellule in base alla quantità di determinanti antigenici espressi in superficie, e, nonostante il FACS ci permetta di ottenere buoni gradi di purificazione (fino al 98,5%), questi potrebbero non essere sufficienti in base al protocollo che si intende seguire, soprattutto se sarà necessario trattare un elevato numero di cellule in maniera rapida: in tal caso si ricorrerà a separazioni di natura meccanica come quella mediante MACS (magnetic-activated cell separation). Il MACS è un'altra tecnica che ci permette l'isolamento di cellule CD24+ CD133+ da cellule doppio negative mediante la coniugazione di biglie paramagnetiche ad anticorpi monoclonali diretti verso gli antigeni di superficie ricercati. Dopo l'incubazione delle cellule con tali anticorpi accoppiati a biglie paramagnetiche, si attua una corsa in una colonna che contiene una rete di ferro cui è applicato dall'esterno un campo magnetico: a questo punto le cellule legate agli anticorpi marcati magneticamente saranno trattenute, mentre le cellule che non presentano tali antigeni saranno eluite. Si ha quindi una selezione attuata in base alle molecole di superficie che una data popolazione cellulare esprime: le cellule, positive per un determinato antigene di membrana, saranno eluite in un secondo momento, quando rimosso il campo magnetico, non saranno più trattenute dalla colonna.

La separazione mediante MACS, prevede tante corse in colonna quanti sono gli antigeni di superficie che sono ricercati. Se difatti fosse performata una sola corsa con l'uso contemporaneo di Ig anti-CD24 e Ig anti-CD133, si potrebbero ottenere due popolazioni: una esprimente il solo CD24, e l'altra caratterizzata da CD133 ma non da CD24. Se al contrario è attuata una prima corsa che permette la selezione delle sole cellule CD24+, e in seguito la frazione positiva per CD24 è separata in base all'espressione di CD133, ciò che sarà ottenuto sarà una

popolazione cellulare doppio positiva.

Anche in questo caso le cellule sono state clonate per limiting dilution.

## Conclusioni

Lo studio qui sintetizzato(1) ha permesso, non solo di evidenziare l'esistenza di una popolazione staminale caratterizzata dalla co-espressione di CD24 e CD133 nel tessuto renale, ma ha anche permesso la sua localizzazione all'interno del glomerulo.

Mediante le tecniche sopra riportate, è possibile la sola individuazione ed identificazione di tale popolazione staminale renale in vitro: esse difatti non sono in grado di fornirci informazioni sull'ubicazione di tali cellule all'interno del glomerulo. La localizzazione di questa popolazione di carattere staminale viene ad essere un'informazione di particolare rilevanza soprattutto per lo studio dei meccanismi rigenerativi, i quali comportano l'homing di tali cellule dalla nicchia in cui risiedono sino al sito in cui si presenta la lesione. La tappa successiva è quindi quella di andare ad identificare la loro localizzazione nel glomerulo, tappa che la rubrica intende trattare nel prossimo numero.

### *Indirizzo degli Autori:*

Duccio Lombardi  
Via B. Scala 23  
50126 Firenze, Italy  
lombarduccio@alice.it

## Bibliografia

1. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2443-56.
2. Kozubenko N, Turnovcova K, Kapcalova M, et al. Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant* 2009.

## Lecture Consigliate

- C.A. Janeway, Jr; P. Travers; M. Walport; M.J. Shlomchik; "Immunobiology", 5th edition, Garland Edition, New York, 2001.
- Susan O. Sharrow, 1991, Overview of Flow Cytometry, *Current Protocols in Immunology*, 5.1.1-5.1.8.
- Brian Herman, 2002, Fluorescence Microscopy, *Current Protocols in Immunology*, 21.2.1-21.2.10.