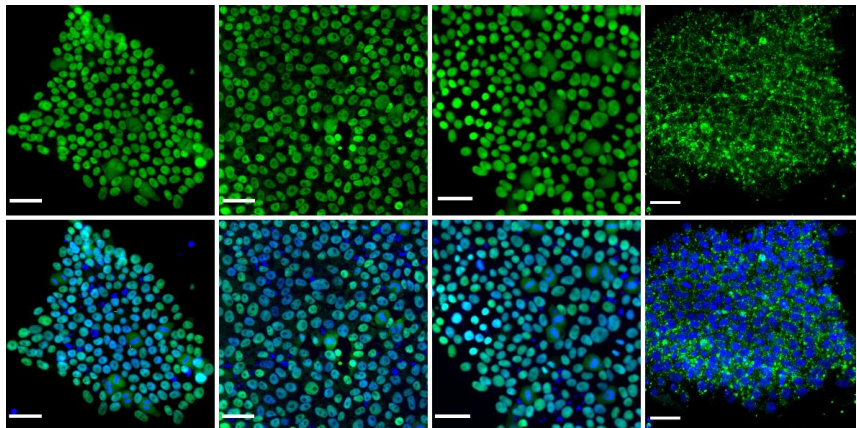


Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW), Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (MDC), Avantea, Safari Park Dvůr Králové, Università di Padova

CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI DI RINOCERONTE BIANCO DEL NORD IL CONSORZIO BIORESCUE FA UN PASSO AVANTI VERSO LE CELLULE UOVO ARTIFICIALI

Il consorzio BioRescue sta sviluppando metodi avanzati di riproduzione assistita per salvare il rinoceronte bianco del nord dall'estinzione. In questa missione gli ovociti delle ultime femmine rimaste giocano un ruolo chiave poiché da essi, tramite la fecondazione in vitro con lo sperma di maschi ormai deceduti, vengono creati embrioni. Il Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC) di Berlino, che fa parte del consorzio BioRescue, sta lavorando con i partner di Monaco e di Kyushu (Giappone) su una seconda strategia: ottenere ovociti a partire da cellule staminali. Il team è riuscito a creare cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) da Nabire, un rinoceronte bianco del Nord. Questo rappresenta un significativo avanzamento nel processo di creazione di iPSC e della loro differenziazione in cellule staminali allo stadio di pluripotenza di tipo primed e naïve. Questo importante avanzamento verso la creazione di ovociti artificiali da cellule staminali è stato pubblicato nella rivista "Scientific Reports".



Rhino stem cells, picture by Sebastian Diecke MDC

Gli scienziati del MDC Technology

Platform "Pluripotent Stem Cells" e dell'Helmholtz Zentrum München sono stati in grado di produrre cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) a partire da cellule cutanee conservate di Nabire, un rinoceronte bianco del Nord che viveva nel Safari Park Dvůr Králové (Repubblica Ceca) dove è morta, nel 2015, all'età di 31 anni. Il giorno stesso della sua morte, gli scienziati hanno prelevato dei campioni di pelle e altri tessuti e li hanno crioconservati per un successivo utilizzo. Il Dr. Micha Drukker, scienziato che si occupa di cellule staminali, e il suo team dell'Helmholtz Zentrum München e del Leiden Academic Centre for Drug Research dell'Università di Leiden sono riusciti a produrre cellule iPSC da questi tessuti utilizzando il metodo della riprogrammazione con vettori episomali. A tale scopo il Dr. Drukker e il suo team hanno introdotto nel genoma delle cellule della pelle del rinoceronte delle molecole di DNA esogeno, i cosiddetti plasmidi. Questi plasmidi contengono dei geni che riprogrammano le cellule della pelle in cellule iPS. È la prima volta che la creazione di cellule iPS a

partire da campioni ottenuti da un rinoceronte di questa età ha avuto successo. Questo migliora significativamente le possibilità di creare ovociti artificiali, da usare per la riproduzione assistita avanzata, a partire da cellule staminali dato che i rinoceronti bianchi del nord donatori di tessuto sono o erano soggetti di età piuttosto avanzata.



Stem cell cultures under the microscope at the MDC lab, photo by Jan Zwilling

Un secondo, ma non meno importante, progresso nel processo e nei protocolli di produzione di cellule staminali di rinoceronte si è avuto grazie alle intuizioni del team sui diversi stadi di differenziazione delle cellule staminali. Le cellule iPS, infatti, hanno diversi stati di differenziazione: possono essere allo stadio di pluripotenza di tipo naïve - lo "stato base" della pluripotenza - o primed. Si pensa che cellule in

quest'ultimo stadio abbiano raggiunto una fase dello sviluppo embrionale leggermente più avanzata. Gli esperimenti su cellule staminali di topo mostrano che queste sono particolarmente efficienti a produrre cellule germinali quando passano dallo stato primed a quello naïve. Quando, però, gli scienziati hanno tentato

per la prima volta di convertire le cellule di rinoceronte in uno stadio di tipo naïve le cellule sono morte. Il team ha quindi introdotto un gene nelle cellule di rinoceronte che impedisce la morte cellulare e con questo hanno avuto successo nella produzione di cellule iPS naïve. "Abbiamo caratterizzato le cellule in dettaglio anche analizzando i dati del trascrittoma", spiega il primo autore Dr.ssa Vera Zywitza che fa parte



Fatu and Najin in enclosure at Ol Pejeta Conservancy, photo by Jan Zwilling

del team guidato dal Dr. Sebastian Diecke della Technology Platform "Pluripotent Stem Cells" del MDC. "Il successo della conversione a uno stato di pluripotenza simile a quello naïve è un punto di partenza promettente per la generazione di cellule germinali".

Tuttavia, la Dr.ssa Vera Zywitza e i suoi colleghi non possono ancora passare alla fase successiva. "Le cellule iPS che abbiamo coltivato contengono ancora del materiale genetico esogeno rappresentato dai fattori di

riprogrammazione e dal gene che impedisce la morte cellulare", spiega la Dr.ssa Zywitza. "Questo significa che non possiamo usarle per creare cellule germinali, perché c'è il rischio che queste vengano alterate patologicamente". Nel frattempo, il team di Diecke ha creato altre cellule iPS usando un virus a RNA per introdurre i fattori di riprogrammazione invece dei plasmidi. Queste nuove cellule iPS non contengono nulla di estraneo e, ora, gli scienziati stanno cercando di produrre da esse cellule germinali primordiali. "Questo lavoro contribuisce significativamente alla comprensione della pluripotenza, ossia della capacità delle cellule staminali di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula del corpo", dice la Dr.ssa Zywitza. "Questo segna un inizio promettente per la coltivazione di cellule germinali e, quindi, rappresenta una importante pietra miliare sulla via verso gli ovociti di rinoceronte generati artificialmente".

Per il rinoceronte bianco del nord la riproduzione naturale non è più possibile dato che la popolazione rimanente è di soli due animali e sono entrambe femmine. Tuttavia, il consorzio BioRescue guidato dal Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW) sta sviluppando metodi che potrebbero rendere possibile la riproduzione nonostante queste circostanze avverse. Gli scienziati del team stanno prelevando ovociti (cellule uovo immature) dalle femmine, li fecondano in laboratorio con sperma scongelato da maschi ormai deceduti per creare degli embrioni, di cui 14 sono stati già crioconservati in azoto liquido. Usando una tecnologia ed un metodo completamente nuovi per i rinoceronti, attualmente in fase di ottimizzazione da parte del team di BioRescue, gli embrioni possono essere impiantati in femmine di rinoceronte bianco del sud che fungono da madri surrogate per dare alla luce la tanto desiderata prole dei rinoceronti più rari del mondo, quelli del nord.

"Ogni passo di questa missione è un territorio scientifico inesplorato. La disponibilità di un numero limitato di ovociti e la bassa variabilità genetica della popolazione rappresentata sono aspetti particolarmente impegnativi da risolvere", dice il leader del progetto BioRescue, il Prof Thomas Hildebrandt, capo del Dipartimento di Gestione della Riproduzione al Leibniz-IZW. Gli ovociti possono essere prelevati e fecondati con successo solo da un individuo, ed è per questo che si stanno cercando strategie per ottenere un maggior numero di ovociti da soggetti diversi non imparentati tra loro. Come parte del consorzio BioRescue, l'MDC e l'Università di Kyushu, insieme ad altri partner come l'Helmholtz Zentrum München, stanno sviluppando metodi per produrre gameti (uova e sperma) da cellule della pelle. Nel 2016, il Prof Katsuhiko Hayashi (Kyushu University) è riuscito a generare ovociti dalla pelle dei topi, fecondarli artificialmente ed impiantarli in femmine di topo e i topi nati con questo metodo erano sani e fertili. "Se riuscissimo a fare lo stesso per il rinoceronte bianco del nord, potremmo smettere il difficoltoso prelievo di cellule uovo da animali vivi e produrre, comunque, embrioni e anche in un numero maggiore", afferma il Dr. Hildebrandt. "Questa strategia aumenterebbe anche significativamente il numero di animali che potremmo usare per produrre gli embrioni". Finora, questo è limitato alle due femmine viventi, utilizzabili come donatrici di ovociti e ai quattro maschi di cui è stato crioconservato lo sperma. Sono, però, disponibili colture cellulari non solo di questi sei individui, ma anche di altri sei rinoceronti bianchi settentrionali, come ad esempio quello di Nabire.

Tutte le procedure del Consorzio BioRescue sono sottoposte a un'approfondita valutazione etica al fine di valutare sistematicamente l'equilibrio tra il benessere degli animali ed il valore conservazionistico delle procedure. Poiché questo è particolarmente importante quando si sviluppano nuove tecnologie innovative per la conservazione, fa parte del team di BioRescue anche un team di specialisti di etica della fauna selvatica guidato dalla Prof.ssa Barbara de Mori dell'Università di Padova. Questo team sta valutando anche la dimensione etica delle procedure legate alle cellule staminali all'interno del BioRescue e continuerà ad accompagnare da vicino ogni ulteriore passo di questa missione.

Nei prossimi mesi e anni gli scienziati del BioRescue affronteranno la sfida di riprogrammare le cellule iPS in modo tale che da esse sia effettivamente possibile produrre ovociti e spermatozoi. Se questo riuscisse, la procedura successiva sarebbe la stessa dell'approccio effettuato finora dal BioRescue. Gli ovociti artificiali verrebbero maturati e fecondati in laboratorio tramite iniezione intracitoplasmatica di sperma (ICSI) per dare origine ad embrioni di rinoceronte bianco del nord. Questi embrioni sarebbero crioconservati in azoto liquido per poi essere scongelati e trasferiti in una madre surrogata della specie affine del rinoceronte bianco del Sud. "L'approccio delle cellule staminali è un pezzo fondamentale del puzzle della nostra missione, ma non ci esime dal dover affrontare anche altri passi impegnativi come il trasferimento degli embrioni in una madre recipiente per dare inizio alla gravidanza", conclude Hildebrandt.

Il progetto BioRescue può essere sostenuto finanziariamente su www.biorescue.org.

Pubblicazione

Zywitza V, Rusha E, Shaposhnikov D, Ruiz-Orera J, Telugu N, Rishko V, Hayashi M, Michel G, Wittler L, Stejskal J, Holtze S, Göritz F, Hermes R, Wang J, Izsvak Z, Colleoni S, Lazzari G, Galli C, Hildebrandt TB, Hayashi K, Diecke S & Drukker M (2022): *Naïve-like pluripotency to pave the way for saving the northern white rhinoceros from extinction*. *Sci Rep* 12, 3100 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07059-w>

Media Package

Una raccolta di immagini è disponibile al seguente indirizzo:

<https://hidrive.ionos.com/share/i5uw4jofzu>

Le immagini possono essere utilizzate solo in diretta connessione con questo comunicato stampa e deve essere indicato "BioRescue/Jan Zwilling", "BioRescue/Khalil Baalbaki" o "BioRescue/Hynek Glos". E' possibile consultare i files per la corretta indicazione.

Contatti

Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW)

Prof Thomas Hildebrandt

BioRescue project head and head of the Department of Reproduction Management

phone: +49305168440

email: hildebrandt@izw-berlin.de

Steven Seet

Head of science communication

phone: +491778572673

email: seet@izw-berlin.de

Jan Zwilling

Science communication

phone: +49305168121

email: zwilling@izw-berlin.de

Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (MDC)

Dr Sebastian Diecke

Head of the Technology Platform “Pluripotent Stem Cells”

email: sebastian.diecke@mdc-berlin.de

Dr Vera Zywitza

Scientist at the Technology Platform “Pluripotent Stem Cells”

email: Vera.Zywitza@mdc-berlin.de

Jana Ehrhardt-Joswig

Editor, communication department

email: Jana.ehrhardt-joswig@mdc-berlin.de or presse@mdc-berlin.de

Helmholtz Zentrum München

Dr Micha Drukker

Head of the group „Human Pluripotent Stem Cells“ at the Institute of Stem Cell Research

email: micha.drukker@helmholtz-muenchen.de

Avantea

Cesare Galli

Director

Phone: +390 / 372437242

Email: cesaregalli@avantea.it

Safari Park Dvůr Králové

Jan Stejskal

Director of Communication and International Projects

Phone: +420608009072

Email: jan.stejskal@zoodk.cz

Padua University

Barbara de Mori

Director of the Ethics Laboratory for Veterinary Medicine, Conservation and Animal Welfare,

Department of Comparative Biomedicine and Food Science

Phone: +39-3403747666

Email: barbara.demori@unipd.it