STUDIO EX VIVO DELLE INTERAZIONI TRA STRESS OSSIDATIVO ED ECCITOTOSSICITÀ IN MALATTIE NEURODEGENERATIVE MEDIANTE IBRIDI CITOPLASMATICI (CIBRIDI)

Prof. Ferrarese Carlo
e-mail: carlo.ferrarese@unimib.it

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Tipo di Ricerca: Corrente

Periodo di svolgimento: 2003

Polo Scientifico: Bosisio Parini

Razionale dello studio

Le alterazioni mitocondriali hanno un ruolo importante nella fisiopatologia di molte malattie neurodegenerative, essendo connesse a fenomeni quali deficit energetico, stress ossidativo ed eccitotossicità. In queste patologie le cellule nervose sono cronicamente esposte a livelli abnormemente elevati di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che derivano principalmente dalla disregolazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale. L'accumulo di ROS ed il deficit energetico ostacolano il trasporto intracellulare di glutammato. Tale aminoacido si accumula nello spazio intersinaptico e provoca una continua stimolazione dei recettori che può determinare morte cellulare con meccanismo apoptotico.
La presente ricerca si concentra su due patologie neurodegenerative relativamente rare, ma contraddistinte da un quadro clinico altamente debilitante e inesorabilmente progressivo, considerate le attuali terapie disponibili: la Neu-ropatia Ottica Ereditaria di Leber (LHON) e la Sclerosi Laterale Amiotrofica (ALS). In entrambe queste malattie si viene a determinare una alterata funzionalità mitocondriale, seppur con meccanismi diversi. Inoltre, le cellule nervose che degenerano nella LHON e nella ALS, ovvero rispettivamente le cellule ganglionari della retina e i motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale e della corteccia motoria, sono cellule altamente sensibili alla tossicità da glutammato. La LHON è una malattia ad eredità matrilineare, che si è dimostrata essere causata da una serie di mutazioni del complesso I della catena respiratoria mitocondriale. Nonostante questa evidente causa genetica, la fisiopatologia della degenerazione delle cellule ganglionari rimane relativamente sconosciuta.
La ALS non è una malattia mitocondriale, ma numerose evidenze supportano la presenza di alterazioni mitocondriali sia nei pazienti con la forma familiare che sporadica della malattia. Queste alterazioni potrebbero essere conseguenti ad un aumentato stress ossidativo primitivo, come suggerito dai casi di ALS familiari associati a mutaziono pro-ossidanti dell'enzima rame/zinco superossido dismutasi (SOD1). In questo studio, che si pone come continuazione della ricerca condotta nel 2002, ci si propone di analizzare le interazioni patogenetiche tra stress ossidativo ed eccitotossicità utilizzando delle linee cellulari transmitocondriali, chiamate anche ibridi citoplasmatici oppure cibridi (cybrids).
Queste linee cellulari derivano dalla fusione di cellule prive di DNA nucleare, ma contenente DNA mitocondriale provenienti da pazienti (nel nostro caso fibroblasti enucleati) con cellule riceventi private di mitocondri in quanto esposte a basse concentrazioni di bloccanti della replicazione del DNA (dette cellule rho zero).

Obiettivi della ricerca

L'utilizzo dei cybrids è stato utilizzato per dimostrare l'influsso di una alterata funzionalità mitocondriale sui processi cellulari, in particolare il trasporto di glutammato ad alta affinità, la produzione di ROS endocellulari e mitocondriali ed i livelli intracellulari di ATP. I risultati finora ottenuti per quanto riguarda la LHON permettono di ipotizzare un reale coinvolgimento della tossicità da glutammato nella patogenesi della malattia. Infatti il modello di cybrids utilizzato esprime in misura maggiore lo stesso trasportatore che è responsabile del reuptake di glutammato nella neuroretina umana.
Tale ipotesi, se ulteriormente avvalorata, comporterebbe una novità importante nel panorama internazionale della ricerca sulla LHON. Infatti tale quadro patogenetico avrebbe possibili implicazioni terapeutiche, in quanto esistono nella pratica clinica dei farmaci con proprietà anti-eccitotossiche.

Gli sviluppi della ricerca prevedono l'effettuazione di studi di RT-PCR e Western Blot sulle linee cybrids, in particolare per EAAT1, per evidenziare se il diminuito trasporto potrebbe essere ricondotto ad una down-regolazione di questo trasportatore nei pazienti LHON. Un ulteriore approfondimento prevede tecniche di biotinilazione e analisi della quantità di trasportatore presente in membrana. Inoltre si prevede l'utilizzo di ulteriori tre linee di cybrids provenienti da pazienti LHON, una per ogni mutazione del complesso I, sulle quali compiere le analisi biochimiche e funzionali sopra citate. In questo modo si otterrebbero un totale di sei linee di cybrids provenienti da pazienti LHON, due per ogni mutazione del complesso I. Per quanto riguarda la ALS, gli studi sul modello in vitro hanno permesso di chiarire che la compromissione del trasporto di glutammato associato alla mutazione SOD1 non è reversibile con il trattamento anti-ossidante, mentre quest'ultimo è in grado di preservare e proteggere l'omeostasi mitocondriale. La creazione dei cybrids a partire dai pazienti ALS permetterebbe di verificare se il trasporto di glutammato e l'espressione dei trasportatori del glutammato sia influenzata dalle alterazioni mitocondriali presenti nelle forme sporadiche della malattia. Questo dato è particolarmente importante, considerato il fatto che non è chiarita la ragione per cui nei pazienti ALS sporadici si assiste ad una down-regolazione del trasportatore EAAT2.
La creazione dei cybrids ALS, finora rivelatasi di difficile realizzazione, rimane un obiettivo primario di questa ricerca. A questo proposito, ci si propone l'utilizzo della linea cellulare NT2, la quale è già presente come linea cellulare stabile presso il laboratorio del dott. Ian Holt presso la University of Cambridge ed è differenziabile sia in neuroni che in astrociti funzionanti ed esprimenti i trasportatori del glutammato EAAT1-2, dopo esposizione ad acido retinoico.

La creazione di cybrids utilizzando le cellule NT2 *rho zero* è possibile mediante l'utilizzo di colture di fibroblasti umani provenienti da pazienti ALS e da soggetti controllo, entrambi presenti nel nostro laboratorio. Considerando quanto sopra esposto, si sono stabiliti accordi per un eventuale soggiorno presso il laboratorio inglese per un periodo da stabilirsi.