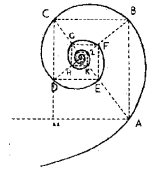




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVII

Anno Accademico 2013/2014

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MED26

**GENERAZIONE DI IPSC COME MODELLO *IN VITRO* E
SVILUPPO DI UN POSSIBILE APPROCCIO TERAPEUTICO
PER LA MALATTIA DI CHARCOT-MARIE-TOOTH DI TIPO 2A (CMT2A)**

Dottorando: Federica RIZZO

Matricola N°R09587

TUTORE: Prof. Giacomo COMI

CO-TUTORE: Dott.ssa Stefania CORTI

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Ch.mo Prof. Mario CLERICI

SOMMARIO

La malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una polineuropatia sensitivo-motoria, caratterizzata da un coinvolgimento dei motoneuroni e dei neuroni sensitivi, che risulta in una progressiva ipostenia agli arti, atrofia muscolare e perdita della sensibilità. Mutazioni nel gene Mitofusina2 (MFN2) sono state identificate come causative della patologia. La proteina MFN2, localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna, svolge funzioni essenziali nel network mitocondriale, la cui alterazione sembra essere alla base dei meccanismi patogenetici di diverse malattie neurodegenerative. Ad oggi, non esistono terapie risolutive per la CMT2A. Lo sviluppo di un'efficace terapia richiede una più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari della patologia, utili da un lato per identificare nuovi target terapeutici, ma anche per definire biomarcatori del fenotipo patologico.

Il primo obiettivo di questo studio è stata la generazione di un modello in vitro di malattia, attualmente non disponibile. La riprogrammazione di cellule somatiche mature in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) offre la possibilità di ottenere cellule paziente specifiche, come motoneuroni e neuroni sensitivi umani, tipicamente affetti nella patologia. Sfruttando questa metodica, abbiamo generato iPSC da un paziente CMT2A e abbiamo dimostrato il differenziamento in motoneuroni paziente specifici. Abbiamo studiato alcuni aspetti del network mitocondriale associati alla patologia, come la localizzazione mitocondriale, la quantità e la stabilità del DNA mitocondriale e l'attività dei complessi della catena respiratoria, nei motoneuroni CMT2A oltre che nei fibroblasti. In particolare, abbiamo osservato un'alterazione della localizzazione dei mitocondri, una riduzione della quantità di DNA mitocondriale e dell'attività dei complessi della catena respiratoria, identificando dei marcatori specifici del fenotipo patologico. Questi difetti sono risultati più marcati nelle cellule neuronali rispetto ai fibroblasti, in accordo con la specificità neuronale della patologia. Accanto ai modelli in vitro, l'analisi degli stessi aspetti è stata condotta nell'unico modello murino attualmente disponibile di CMT2A (MitoCharc 1), per ampliarne la caratterizzazione alla ricerca di biomarcatori del fenotipo patologico.

Come secondo obiettivo, ci siamo focalizzati sullo sviluppo di un approccio terapeutico per questa patologia. A questo proposito, abbiamo silenziato il gene MFN2 endogeno mediante short harpin RNA (shRNA) nei fibroblasti CMT2A. In parallelo, nelle stesse cellule, per ripristinare i normali livelli di espressione del gene MFN2, abbiamo introdotto il c-DNA del gene MFN2 modificato in modo da resistere al processo di silenziamento. I risultati ottenuti con questa strategia nei fibroblasti CMT2A sono stati molto promettenti e ci hanno permesso di ottenere alcuni dati preliminari anche nel modello murino.

In conclusione, questo studio ha contribuito ad approfondire i meccanismi molecolari patogenetici attraverso la generazione di un modello in vitro di CMT2A con iPSC paziente specifico e di identificare una possibile strategia terapeutica per la CMT2A.

RINGRAZIAMENTI

A lavor concluso, qualche ringraziamento è doveroso.

Sono tante le persone che meritano il mio grazie perché, con grande affetto e professionalità, mi hanno accompagnata, sostenuta ed aiutata in ogni fase di questo lavoro di ricerca.

Grazie di cuore all'“Associazione progetto mitofusina2”, cui questo lavoro deve tantissimo non solo per il loro supporto economico, di certo indispensabile, ma anche per la fiducia e l'affetto che hanno riposto in me fin da subito.

Un grazie sentito al Prof. Comi e alla Dott. Corti che mi hanno proposto di partecipare ad un progetto a cui non è stato difficile appassionarsi e che hanno seguito con interesse ed attenzione ogni fase di questo studio.

Grazie al gruppo del Prof Moggio per l'aiuto in particolare nelle analisi istologiche.

Da ultimo, grazie a tutti i miei colleghi che mi hanno supportato e consigliato, contribuendo con la loro disponibilità e il loro entusiasmo ad arricchire questo lavoro.