

Titolo: Modelli 3D di miopatie per lo studio di strategie e trattamenti anti-infiammatori

Le malattie rare con un numero di casi stimato inferiore ai 50-60/100,000 di abitanti, includono malattie neurologiche e miopatie. Esiste tuttora un divario importante tra le scoperte della ricerca di base e lo sviluppo delle terapie e anche se il numero degli orphan drugs è in aumento la maggioranza delle malattie rare con eredità di tipo mendeliano ancora necessita di terapia genica o cellulare. Le distrofie muscolari, MDs, sono malattie genetiche rare caratterizzate da progressiva debolezza muscolare, degenerazione muscolare e sostituzione fibro-adiposa. Il fenotipo patologico delle MDs raramente è legato ad un malfunzionamento di un singolo gene, ma piuttosto deriva dal malfunzionamento di più pattern molecolari. Non esistono ad oggi cure definitive per le MDs e sforzi significativi sono rivolti alla possibilità di correzione dei difetti genetici e alla induzione di rigenerazione muscolare. L'infiammazione risulta fondamentale nell'induzione di rigenerazione, ma in molte MDs, il continuo rilascio di prodotti della degenerazione muscolare contribuiscono al mantenimento dell'infiammazione e alla patogenesi della malattia. Inoltre numerose scoperte nelle MDs evidenziano come non ci sia soltanto un meccanismo immunitario, ma suggeriscono anche che l'intervento di meccanismi di regolazione immunitaria endogena possano contribuire a differenti risposte immunitarie nelle diverse MDs. I trattamenti terapeutici standard per le MDs si basano sull'impiego di steroidi che hanno come effetti collaterali debolezza muscolare e atrofia. Pertanto, risulta fondamentale una corretta modulazione della risposta immunitaria come opzione terapeutica innovativa con minori effetti collaterali. La terapia cellulare come quella costituita da trapianto di cellule staminali mesenchimali (MSC) potrebbe rappresentare una strategia per indurre la riparazione /rigenerazione tissutale per numerose MDs ed altre patologie muscolari. Inoltre, le MSCs mediano effetti favorevoli mediante un sistema di signalling paracrina che stimola i meccanismi di guarigione tissutale mediante un effetto anti-infiammatorio, anti-fibrotico e anti-angiogenetico. Nel presente progetto di ricerca utilizzeremo mioblasti immortalizzati da pazienti con diverse MDs coltivandole su scaffold stampati in 3D, ricreando un microambiente per cellule staminali e in seguito verrà effettuata una co-coltura con MSCs e cellule immuni per studiare il meccanismo infiammatorio e la possibilità di una sua modulazione mediante MSCs come caratteristica comune a differenti MDs. Focalizzeremo lo studio nell'individuare i markers infiammatori ed i relativi pattern molecolari analizzando il secretoma e il trascrittoma così come il profilo dei miRNA. Questa fase è cruciale per la comprensione del ruolo dell'infiammazione nei disordini muscolari e l'azione immunomodulatoria delle MSC per trovare possibili attori chiave e target per trattamento farmacologico. L'utilizzo di un sistema 3D permetterà anche la valutazione di drug repositioning e il test di numerosi farmaci da librerie di composti chimici o farmaci naturali in una modalità high-throughput. La riduzione dei costi e la velocità nel tempo di valutazione mediante queste tecnologie innovative le rende interessanti soprattutto per questo tipo di patologia per le quali il modello convenzionale di ideazione e creazione di nuovi farmaci è lunghissimo e molto costoso. I risultati del progetto potranno essere considerati come proof-of-concept per un sistema innovativo di drug testing, non soltanto per malattie rare evitando infine la sperimentazione animale convenzionale.

Obiettivi principali

Il progetto si propone di studiare il meccanismo infiammatorio su mioblasti umani da pazienti affetti da differenti miopatie come le MDs caratterizzate tutte da infiammazione che contribuisce allo sviluppo della patologia. Utilizzeremo i mioblasti immortalizzati coltivati su scaffold 3D biostampati costituiti da materiale biocompatibile e biorisorbibile ricreando spazialmente un microambiente muscolare scheletrico. Focalizzeremo l'attenzione sull'infiammazione ed i pattern molecolari ad essa collegati studiando il secretoma e il trascrittoma. Utilizzeremo nello studio dei meccanismi infiammatori tecnologie convenzionali e tecniche omiche quali le attività trascrittomica e la secretomica. Inoltre studieremo l'azione

immunomodulatoria diretta o indiretta (utilizzando mezzi di coltura condizionati) delle cellule MSC isolate da placenta umana a termine, una popolazione di cellule staminali per una possibile approccio innovativo di terapia cellulare per queste rare malattie.

Conclusioni

La comprensione del ruolo dell'infiammazione nelle malattie muscolari è cruciale per la ricerca di attori chiave e target per il trattamento farmacologico. L'utilizzo di uno scaffold biostampato in 3D per colture cellulari permetterà anche il drug repositioning e il testing di numerosi composti da librerie chimiche e farmaci naturali secondo una modalità high-throughput. Inoltre lo studio dell'effetto immunomodulatorio delle cellule MSCs e lo screening di piccole librerie di composti con attività anti infiammatoria porterà a nuove possibili strategie terapeutiche che agiscono specificamente sulla risposta infiammatoria

Materiali e metodi

Utilizzeremo mioblasti umani immortalizzati da pazienti con malattie muscolari che verranno coltivati su superfici plastiche standard in 2D o specificamente su scaffold biostampati 3D mediante bioinchiostri.

Stabiliremo co-culture su scaffold di mioblasti con cellule della attivazione della risposta immunitaria e della sua modulazione con e senza l'aggiunta di mezzi condizionati ottenuti dalle MSCs.

Studieremo la vitalità dei mioblasti, la capacità di proliferazione, l'abilità miogenica con particolare attenzione agli aspetti morfologici della fusione cellulare mediante immunofluorescenza e microscopia elettronica e valutando il livello di espressione proteica specificamente per quanto riguarda le proteine regolatorie dei differenti step della miogenesi (MRFs) mediante Real Time PCR e Western blot (WB).

Raccoglieremo i mezzi condizionati del sistema di co-cultura per l'analisi del secretoma focalizzando l'attenzione sull'espressione proteica legata all'infiammazione, all'apoptosi ed ai Fattori di crescita (GFs) ed al trascrittoma con particolare interesse per l'espressione dei geni coinvolti nel pathway infiammatorio. Per gli studi di trascrittomica e secretomica utilizzeremo il sistema Quantigene Plex RNA e la tecnologia Luminex xMAP.

Gli effetti immunomodulatori esercitati dalle MSCs perinatali verrà valutata studiando la proliferazione dei PBMCs mediante metodo colorimetrico BrdU-ELISA e test di proliferazione cellulare; il numero di T-Reg cell verrà calcolato mediante l'espressione dei marker FoxP3, CD4, CD25 mediante citometria a flusso. Inoltre, il livello immunomodulatorio rilevante di sHLA-G e IL-10 nel sovrantante delle co-culture verrà valutato mediante test ELISA o Western Blot.

Piano di attività di formazione dell'Assegnista

Apprendimento di metodiche di laboratorio per l'esecuzione di saggi di:

1. Colture cellulari su supporti standard e su scaffold 3D e protocolli di differenziamento cellulare.
2. Metodiche di immunofluorescenza e microscopia elettronica
3. Metodiche di biologia molecolare (estrazione RNA, RT-PCR, Real-time PCR).
4. Western Blotting e quantificazione proteica.
5. Metodiche di citofluorimetria ed ELISA.