

## **RELAZIONE DI FINE PERIODO di Elena Gallia presso KU Leuven University**

### **Borsa di Studio per Ricercatori all'estero**

#### **Il ruolo specifico dei recettori metabotropi glutammatergici del gruppo 1 a livello cellulare nella Sclerosi Laterale Amiotrofica**

Secondo il progetto di collaborazione definito con la KU Leuven University, il mio lavoro di ricerca si focalizza sullo studio del ruolo dei recettori metabotropi del gruppo 1 nella Sclerosi Laterale Amiotrofica. Più nel dettaglio l'attenzione è rivolta all'effetto che una loro parziale o totale ablazione ha sul fenotipo e sullo stato attivato degli astrociti, ottenuti in coltura primaria da topi SOD1G39A, e sui motoneuroni ottenuti da topi SOD1G93A e prodotti in cocoltura con gli astrociti stessi.

Il razionale del progetto prevede di lavorare su un sistema di cellule in co-coltura, costituito da astrociti monostratificati a confluenza, su cui viene fatta crescere una popolazione di motoneuroni ottenuti dal tratto ventrale della spinal cord di topi SOD1G93A. Attraverso un silenziamento genico operato a livello astrocitario, mediante l'utilizzo di un oligonucleotide antisense (ASO) selettivo verso i recettori metabotropi di tipo 5, sarà possibile valutare gli effetti che la totale ablazione del recettore ha sulla sopravvivenza dei motoneuroni.

Durante i primi mesi di permanenza presso il VIB – Vesalius Research Center, ho appreso la metodica di preparazione di colture cellulari primarie di astrociti e motoneuroni a partire da topi transgenici SOD1G93A, sia in monocoltura che in co-coltura. Inizialmente ho lavorato producendo parallelamente due diversi sistemi in co-coltura, un primo sistema caratterizzato da motoneuroni ottenuti dalla spinal cord ventrale di embrioni E14 piastrati su uno strato di astrociti embrionali E14 e un secondo sistema in cui la popolazione di motoneuroni ventrali E14 vengono fatti crescere su uno strato di astrociti adulti ottenuti da topi SOD1G93A nella fase terminale della patologia (120giorni). Per ragioni legate esclusivamente al fattore tempo, e quindi per ottimizzare al meglio la mia permanenza fuori sede, ho deciso di procedere utilizzando esclusivamente il sistema di co-culture che vede sia la popolazione astrocitaria che neuronale di derivazione embrionale, questo perché ottenere astrociti da animale adulto e sintomatico ha una resa inferiore e richiede l'utilizzo di un maggior numero di animali. Attraverso la messa a punto di questa metodica è possibile ottenere dal tratto ventrale di una singola spinal cord entrambe le popolazioni cellulari, purificate grazie all'utilizzo di un gradiente in Optiprep. Al termine della procedura sarà possibile seminare gli astrociti in mono-coltura e i motoneuroni su un letto di astrociti a confluenza ottenuti da una preparazione precedente ( il tempo necessario perché gli astrociti vadano a confluenza è di circa 1 settimana ).

Per procedere sperimentalmente ho selezionato le seguenti combinazioni cellulari:

- Astrociti embrionali WT + Motoneuroni embrionali WT
- Astrociti embrionali G93A + Motoneuroni embrionali G93A ( a conferma di un dato storico già presente in letteratura )
- Astrociti embrionali G93A + Motoneuroni embrionali G93A
- Astrociti embrionali G93A trattati con l'ASO + Motoneuroni embrionali G93A

La genotipizzazione degli embrioni utilizzati in corso d'opera viene fatta a posteriori attraverso la messa a punto di una PCR.

Una volta appresa la metodica di preparazione delle co-culture cellulari, e relativa genotipizzazione ho focalizzato la mia attenzione sull' apprendimento del metodo più consono per valutare la sopravvivenza dei motoneuroni, andando a fare una conta cellulare tri- settimanale.

Consolidate queste tre metodiche ho iniziato a eseguire il silenziamento genico sulla popolazione astrocitaria mediante trattamento con l'oligonucleotide antisense. Tenendo in considerazione il range di concentrazione d'utilizzo ottimale, indicato dalla ditta produttrice, ho scelto di trattare le mie cellule con l'ASO 10000nM per 48 o 72h. Il trattamento è stato pianificato così da disporre delle seguenti popolazioni cellulari :

- Astrociti embrionali SOD1+ di controllo
- Astrociti embrionali SOD1+ trattati con l'ASO
- Astrociti embrionali SOD1G93A di controllo
- Astrociti embrionali SOD1G93A trattati con l'ASO

Per valutare l'efficacia del trattamento ho dapprima estratto l'RNA dalle mie cellule, quindi ho retro trascritto l'RNA in cDNA e sul materiale così ottenuto ho apprestato una qPCR. I risultati ottenuti purtroppo mettono in luce come il recettore di interesse, mGluR5, sia poco espresso sia sulle cellule di controllo sia sulle cellule trattate con l'ASO. Il dato ottenuto credo dipenda dal fatto che i recettori di interesse non vengano espressi in età embrionale. Per questa ragione è mio interesse una volta tornata in Italia, continuare il progetto, andando dapprima ad accertare se un silenziamento condotto su astrociti adulti sia efficace. Nel caso il riscontro sia positivo il mio obiettivo sarà quello di creare dei sistemi in co-cultura costituiti da astrociti adulti di controllo o silenziati con l'ASO su cui far crescere una popolazione di motoneuroni, per studiare se e come il silenziamento influenzi la sopravvivenza dei motoneuroni stessi.

Data : 06-04-2017

Firma

