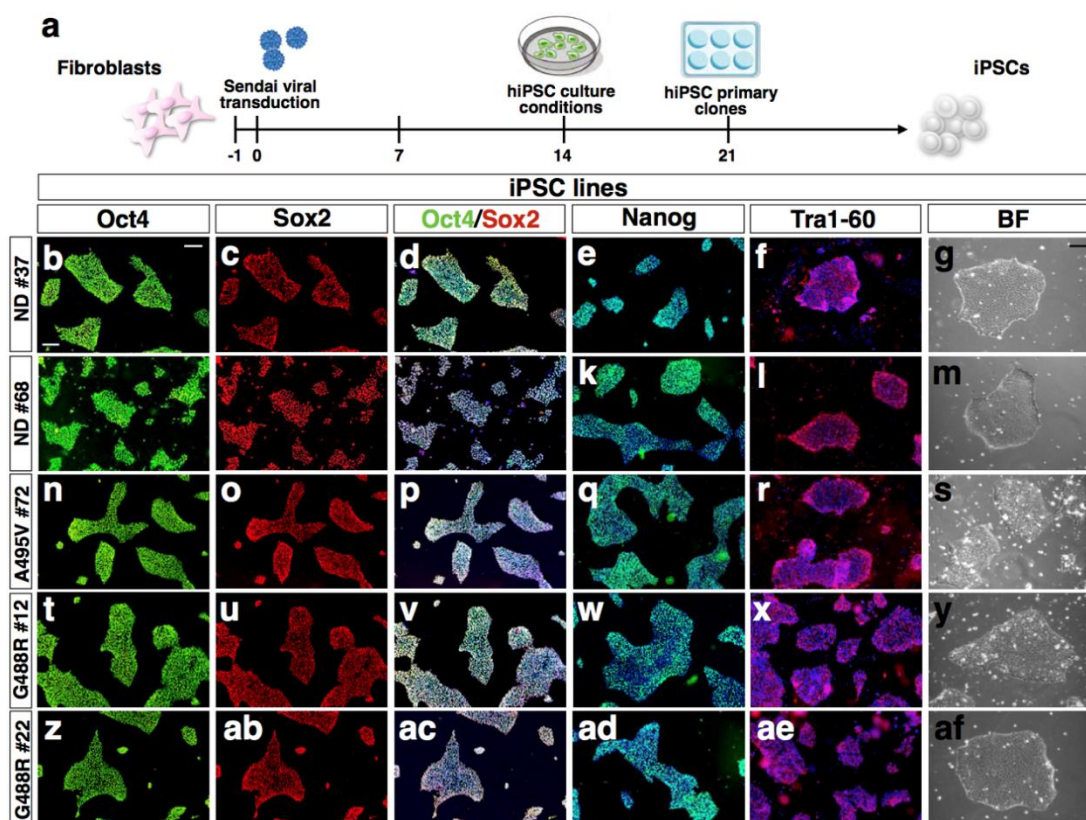


## Risultati intermedi del progetto

Il Consorzio, a partire da campioni di fibroblasti di pazienti con malattia di Parkinson forniti da Fondazione Grigioni, ha generato **linee di cellule staminali (Induced Pluripotent Stem Cells – iPS)** per studiare nuovi meccanismi implicati nello sviluppo e progressione della patologia. Tali meccanismi patogenetici sono collegati a disfunzioni del mitocondrio che portano alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*.

In particolare, le attività di ricerca hanno portato alla creazione di linee cellulari iPS da pazienti portatori delle più importanti mutazioni genetiche responsabili dei difetti mitocondriali collegati al Parkinson (geni OPA1, POLG e TWINKLE) e di linee iPS da pazienti con forma idiopatica di malattia, che saranno utilizzate per confermare i meccanismi patologici identificati sulle linee con mutazioni in geni specifici.

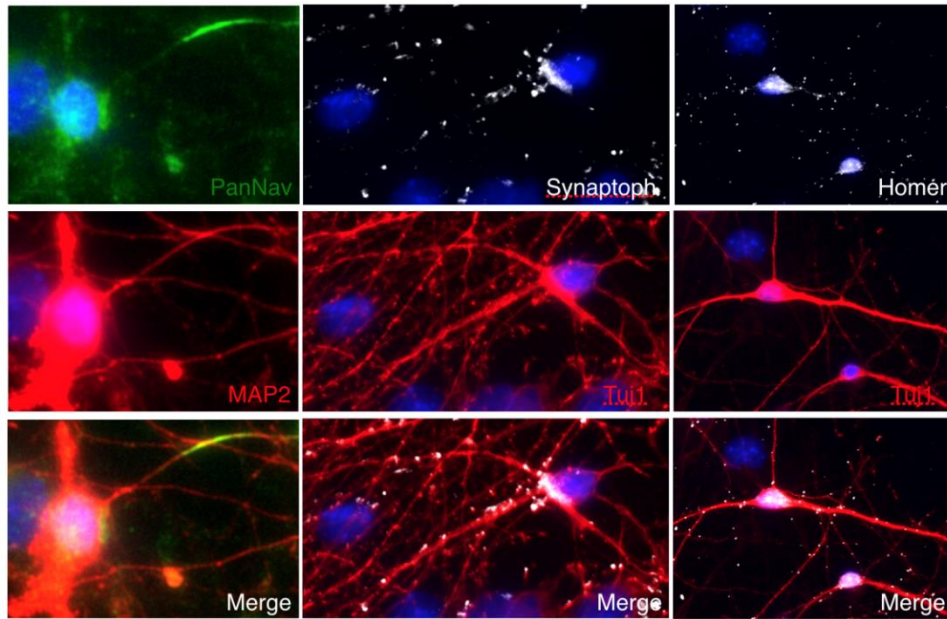
La figura sotto illustra il processo di generazione delle linee staminali.



Lo sviluppo di queste linee di iPS stabilisce un primo catalogo di cellule staminali che raggruppa le più importanti mutazioni responsabili dei difetti mitocondriali che causano la malattia di Parkinson.

Ogni linea di cellule staminali riprogrammate iPS è stata congelata in numerosi replicati e sottoposta a crioconservazione.

In questi mesi è stato anche messo a punto il **protocollo di differenziamento in vitro delle cellule staminali iPS in neuroni** di corteccia cerebrale o neuroni dopaminergici. Per validare la maturità dei neuroni generati da pazienti e da donatori sani (controlli) sono state **condotte analisi funzionali**. Queste hanno confermato che i neuroni generati dal differenziamento delle cellule staminali iPS sono maturi e possono essere mantenuti in vitro per settimane senza perdere le loro proprietà funzionali.

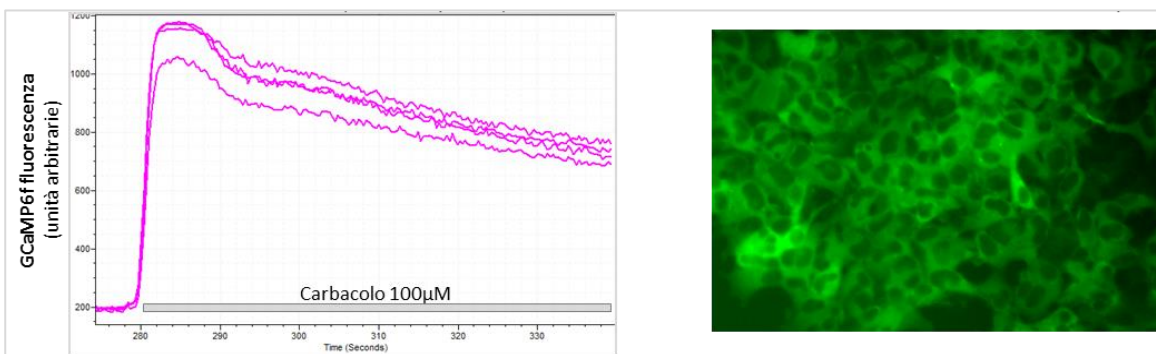


**Analisi dei neuroni derivati dalle cellule staminali iPS per l'espressione dei marcatori neuronali NaV, TUJ1 e MAP2 e delle strutture sinaptiche Synaptophysina e Homer.**

Inoltre, sono state svolte delle attività finalizzate a valutare la performance **di indicatori geneticamente codificati, sensibili a parametri cellulari coinvolti nel funzionamento neuronale**, per selezionare i più adatti per lo sviluppo di saggi di screening.

Gli indicatori selezionati, riflettono meccanismi di segnalazione cruciali per la trasmissione del segnale nervoso, che spesso presenta variazioni estremamente rapide e di debole ampiezza. La scelta di indicatori geneticamente codificati consente uno studio sensibile e temporalmente preciso del segnale e rappresenta una valida alternativa all'utilizzo di indicatori chimici altamente citotossici.

Un esempio dei risultati ottenuti su linee immortalizzate di mammifero (derivanti da cellule umane) stimulate con potassio extracellulare è mostrato nel grafico **della figura sotto**, insieme alla forte fluorescenza localizzata in membrana citoplasmatica osservata a microscopio.



In aggiunta, il Consorzio ha ottimizzato le condizioni di coltura e piastratura delle cellule iPS e dei protocolli sperimentali per condurre saggi in *high-content* e *high-throughput* screening (HCS e HTS). Parallelamente sono state identificate alcune alterazioni morfo-funzionali cellulari (morfologia e potenziale mitocondriale e risposta a stress ossidativo) che è possibile studiare in condizioni di completa automazione. Tali condizioni verranno utilizzate per testare i modelli cellulari sviluppati nell'ambito del progetto iPS light.