

Utilizzo dei fibroblasti in coltura nella diagnostica biochimica delle malattie da accumulo lisosomale

Vanna Chigorno¹, Marina Pitto², Sandro Sonnino¹, Giancarlo Goi¹

¹Dipartimento di Chimica, Biochimica e Biotecnologie per la Medicina, Università di Milano, Milano

²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Milano-Bicocca, Milano

ABSTRACT

Use of cultured fibroblasts for the biochemical diagnosis of lysosomal metabolic diseases. This review delineates the main advantages deriving from the use of cultured fibroblasts for the biochemical diagnosis of metabolic diseases. Fibroblasts can be frozen in liquid nitrogen and successively re-plated and cultured without undergoing metabolic modifications, thus making possible the execution of comparative metabolic studies on viable cells. Furthermore, the use of these cells for the biochemical diagnosis of lysosomal diseases is described and the specific techniques for their recognition, principally using radioactive and/or fluorescent substrates, are summarized.

INTRODUZIONE

Da quando, agli inizi del ventesimo secolo, Sir Archibald Garrod intraprese i suoi primi studi sull'alcaptonuria, centinaia di malattie metaboliche geneticamente determinate sono state identificate e classificate ed il loro riconoscimento costituisce oggetto di diagnosi differenziale non solo per il pediatra, ma anche per il medico di Medicina Generale. Oltre alle emergenti e sempre in maggiore espansione tecniche diagnostiche basate sull'analisi del DNA, un ruolo di primo piano nell'indagine per l'accertamento di tali malattie spetta tuttora alle tecniche biochimiche, in quanto permettono di indagare lo step metabolico coinvolto e di avere maggiori informazioni sulla patogenesi e quindi la prognosi di tali malattie. Inoltre, per le malattie di cui a tutt'oggi non è conosciuto il difetto molecolare, le analisi biochimiche rimangono l'unica possibilità di diagnosi.

Un aspetto importante nella pratica clinica dei disordini metabolici è la corretta selezione dei campioni diagnostici. Poiché la sede di produzione degli enzimi è cellulare e primitivamente nelle cellule si estrinseca il danno derivante dall'interruzione metabolica, il materiale più appropriato per l'individuazione e lo studio di questi difetti è costituito da cellule. Queste devono essere opportunamente scelte in base sia alla facilità di reperimento sia alla loro capacità di espressione genotipica, che deve essere la più ampia possibile.

La tecnologia delle colture cellulari è oggi ben standardizzata tanto che coltivare cellule somatiche in vitro si può ormai considerare routine. Le cellule in coltura presentano, infatti, numerosi vantaggi, tra cui la capacità di incorporare precursori radioattivi, la possibilità di effettuare studi ripetuti senza ricorrere al paziente e la relativa facilità con cui possono essere svolti studi comparativi su differenti pazienti. Per questi motivi le cellule in coltura, in particolare i fibroblasti, sono stati e sono essenziali per chiarire il difetto biochimico presente in

numerosi disordini metabolici. Ulteriori vantaggi diagnostici derivanti dall'utilizzo dei fibroblasti in coltura sono la facile reperibilità, condizioni di coltura facilmente standardizzabili e controllabili, la possibilità di mantenere le cellule vitali in azoto liquido con conservazione pressoché illimitata del ceppo, permettendo così la ripresa di studi a distanza di anni alla luce di nuovi dati di ricerca o per successive indagini famigliari e/o diagnosi prenatali. È possibile, inoltre, il trasporto da un laboratorio all'altro e l'ottenimento di notevoli quantità di materiale, data la elevata velocità di riproduzione dei fibroblasti, che possono essere replicati per molti passaggi subculturali senza subire modificazioni metaboliche.

L'unica limitazione nell'uso dei fibroblasti in coltura per lo studio e la diagnosi del difetto metabolico presente nei disordini congeniti è che l'attività metabolica in questione possa essere non espressa in tali cellule. Da ciò deriva che l'impiego dei fibroblasti nella diagnostica delle malattie geneticamente determinate deve essere preceduto da accurati accertamenti sulla possibile implicazione d'isoenzimi organo- o tessuto-specifici e sulla capacità dei fibroblasti di esprimere normalmente l'enzima interessato. Particolare attenzione deve essere posta alla selezione corretta delle cellule di controllo, che, oltre che provenire da soggetti sicuramente sani e di età comparabile a quella dei pazienti, devono avere al momento dell'analisi un numero di subcolture (numero di passaggi dal momento dell'espianto) ed un grado di confluenza (percentuale della superficie a disposizione occupata dalle cellule) paragonabile ai fibroblasti in esame (è sempre consigliabile non far andare le cellule in overconfluenza, situazione in cui avvengono modificazioni metaboliche, ma utilizzarle quando non superano l'80% di confluenza) (1). Queste osservazioni derivano dal fatto che è noto che i fibroblasti in coltura sono un ottimo modello di invecchiamento in vitro (cellule, provenienti da soggetti pediatrici, che hanno subito numerosi passaggi in coltura modificano le proprie caratteristiche metaboli-

che e morfologiche manifestando le caratteristiche di cellule provenienti da soggetti anziani) e dal fatto che coltivare i fibroblasti per più passaggi fino allo stadio di overconfluenza modifica in modo drammatico il pattern di lipidi di membrana tipici di queste cellule, coinvolti nel processo di riconoscimento cellula-cellula e di inibizione da contatto (1).

ALLESTIMENTO DI COLTURE DI FIBROBLASTI

La tecnica più semplice e più largamente utilizzata per l'allestimento di colture di fibroblasti è la biopsia cutanea, facilmente effettuabile dal medico utilizzando specifici bisturi circolari ("biopsy punch") del diametro di 5 mm. Importante è non utilizzare disinfettanti che contengano iodio, che viene assorbito dal tessuto impedendo la successiva crescita cellulare; ottimo a questo scopo è l'hybitane. Il prelievo biotico deve essere poi posto nell'idoneo terreno per il trasporto al laboratorio di colture cellulari, che è costituito da medium di Eagle, contenente sali di Earle (EMEM), e supplementato con antibiotici, glutammina e siero di vitello fetale al 20%. Ottimo per il trasporto è anche il terreno utilizzato per l'analisi del cariotipo, facilmente reperibile in qualsiasi ospedale. Una volta giunto a destinazione, il frammento di cute deve essere privato il più possibile dell'epidermide, lavato in terreno e sezionato in cubetti di circa 1 mm di lato. Questi vanno quindi trasferiti in "flasks" e posti in termostato umidificato a 37 °C, in atmosfera di CO₂ al 5%, ricoperti dallo stesso terreno, finché non si osservi al microscopio in contrasto di fase la crescita di fibroblasti che si dipartono dai frammenti aderendo alla superficie della plastica. A questo punto si può cambiare il terreno, che andrà poi regolarmente sostituito due volte alla settimana, sostituendolo con EMEM contenente il 10% di siero fetale di vitello (FCS). Tutte le volte che si osservi la crescita confluyente della coltura è necessario propagare le cellule, staccandole dal supporto con una soluzione di tripsina (0,05% + EDTA 0,02%) e suddividendole in altre "flasks" (in genere da 1 a 3).

DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE LISOSOMALI

I lisosomi sono gli organelli cellulari deputati alla digestione delle macromolecole. Essi presentano un aspetto morfologico eterogeneo che riflette la vasta gamma di funzioni digestive in cui sono specializzati, che va dal ricambio di costituenti intra od extracellulari, alla digestione di microrganismi fagocitati, fino all'assimilazione del colesterolo presente nelle LDL plasmatiche. Alcune recenti ricerche hanno messo in evidenza che il ruolo dei lisosomi non è solo quello di un "apparato digestivo" della cellula, ma, in alcuni tipi cellulari, di derivazione ematopoietica, con ruoli di secrezione; i lisosomi e l'apparato secretore sono un unico comparto svolgendo un ruolo importante non solo nei processi di secrezione, ma anche di maturazione delle specifiche sostanze di secrezione (2).

Sono fondamentalmente costituiti da una membrana che racchiude uno spazio interno, il lisosol, caratteristi-

camente mantenuto ad un pH acido, a spese di ATP, dal funzionamento di pompe protoniche situate sulla membrana. Il lisosol contiene in soluzione batterie di enzimi idrolitici, di relativamente bassa specificità, caratterizzati dall'aver un pH ottimale d'azione acido e dal contenere catene oligosaccaridiche ad alto contenuto di mannosio. Alcuni residui di mannosio sono fosforilati in posizione 6 (3). Tali enzimi agiscono in sequenza nella degradazione delle macromolecole costituite da unità ripetitive, come ad esempio polipeptidi, oligosaccaridi, polinucleotidi, partendo da un'estremità e portando alla liberazione delle singole unità. Queste non vengono ulteriormente degradate, ma devono uscire dal lisosoma per il catabolismo terminale o l'eventuale riutilizzo metabolico.

Le malattie d'accumulo lisosomali sono patologie geneticamente determinate nelle quali il fenotipo clinico, l'età d'insorgenza e la prognosi sono molto variabili. Si calcola comunque che tali malattie costituiscano 1-5% dei disordini congeniti che, a loro volta, hanno nei nati vivi un'incidenza del 4-6% (4). Per un approfondimento della storia naturale degli enzimi lisosomali e delle patologie genetiche ad essi correlate, si rimanda a quanto riportato in letteratura (3,5). Esse sono il risultato della incapacità genetica di esprimere adeguatamente la struttura, compromettendone la funzione, di una o più delle molteplici attività enzimatiche richieste per la completa degradazione di un'ampia varietà di molecole complesse. Ne deriva l'accumulo di un prodotto parzialmente degradato all'interno dei lisosomi, i quali si rigonfiano assumendo aspetti morfologici differenti a seconda della molecola interessata. La patogenesi è ancora alquanto controversa, in quanto non sempre e non solo riconducibile all'insulto meccanico provocato nella cellula dai lisosomi ingrossati ed infarciti di materiale indigerito. Devono essere infatti prese in considerazione anche le possibili ripercussioni metaboliche della compromissione funzionale dell'apparato lisosomale stesso, che non sarebbe più in grado di rispondere adeguatamente alle fluttuazioni della domanda funzionale. Infine, potrebbe essere chiamata in causa l'azione citotossica specifica di alcuni derivati degli stessi prodotti di accumulo, quali i lisosfingolipidi nelle sfingolipidosi.

Molteplici sono i motivi che possono portare alla carente attività di un enzima lisosomale. Infatti, il deficit di attività enzimatica può essere il risultato di una lesione genetica operante a diverso livello nel processo di predisposizione dell'enzima lisosomale attivo: la biosintesi del polipeptide, la sua glicosilazione, l'indirizzamento del precursore enzimatico verso i lisosomi e la sua maturazione all'interno del lisosoma stesso. La lesione genica può inoltre riguardare non direttamente l'enzima lisosomale. È il caso dell'assenza di fattori proteici o di fattori protettivi contro la degradazione (6). Anche l'assenza o l'anomalo funzionamento di "carriers" di membrana addetti all'efflusso di cataboliti formati all'interno dei lisosomi può generare accumulo lisosomale.

Inoltre, l'indirizzamento del precursore enzimatico verso i lisosomi è mediato da uno specifico recettore che riconosce il mannosio-6-fosfato. Questo recettore si ricicla tra il trans-Golgi, i lisosomi e la membrana plasmati-

Tabella 1

Condizioni e raccomandazioni per la massima attività nella misurazione fluorimetrica della attività delle glicoidrolasi lisosomiali dei fibroblasti

Enzima	pH ottimale	Tampone ottimale*	Concentrazione di substrato saturante (mmol/L)	Tempo di incubazione lineare fino a**	Quantità di proteine cellulari (µg)
N-acetil-β-D-glucosaminidasi	4,5	citrato	3,2	150 min	5-60
β-D-glucuronidasi	3,6	acetato	0,8	90 min	5-90
β-D-galattosidasi	4,4	acetato	2,0	120 min	20-90
α-D-galattosidasi	5,0	acetato	6,0	180 min	20-90
α-L-fucosidasi	5,0	acetato	1,0	150 min	20-90
α-D-glucosidasi	6,0	acetato	4,0	180 min	20-90
β-D-glucosidasi	5,0	acetato	3,0	180 min	20-90
α-D-mannosidasi	4,2	citrato	3,2	120 min	20-90

*Concentrazione finale: 50 mmol/L.

**Temperatura di incubazione per tutti gli enzimi: 37 °C.

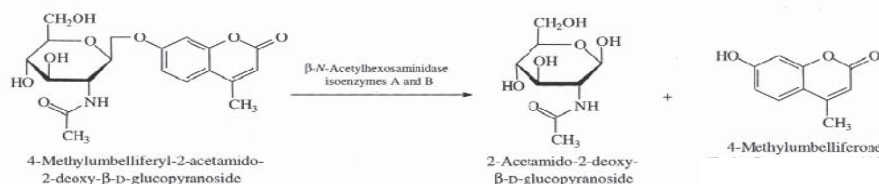
Tabella 2

Condizioni e raccomandazioni per la massima attività nella misurazione fluorimetrica della attività delle glicoidrolasi lisosomiali rilasciate dai fibroblasti nel medium di coltura

Enzima	pH ottimale	Tampone ottimale*	Concentrazione di substrato saturante (mmol/L)	Tempo di incubazione lineare fino a**	Volume di medium raccomandato (µL)
N-acetil-β-D-glucosaminidasi	4,2	citrato	6,0	6 ore	50
β-D-glucuronidasi	3,6	acetato	4,0	6 ore	50
β-D-galattosidasi	3,3	acetato	2,0	2 ore	50
α-D-galattosidasi	4,5	acetato	8,0	5 ore	50
α-L-fucosidasi	5,0	acetato	0,4	4 ore	50
α-D-glucosidasi	4,0	acetato	2,2	2 ore	50
β-D-glucosidasi	4,5	acetato	6,0	5 ore	50
α-D-mannosidasi	4,0	citrato	4,0	5 ore	50

*Concentrazione finale: 50 mmol/L.

**Temperatura di incubazione per tutti gli enzimi: 37 °C.

**Figura 2**

Schema della reazione di idrolisi operata sui metil-umbelliferil-derivati da parte di idrolasi lisosomiali: l'esempio è quello della β-N-acetil-esosaminidasi.

usata per preparare tutte le soluzioni deve essere bidistillata in un apparecchio di vetro e immagazzinata in contenitori di vetro chiusi.

A) Soluzioni tampone acetato o citrato (0,5 mol/L).

B) Soluzioni di substrato.

Il 4-MU-glicoside specifico nella quantità richiesta deve essere preparato in soluzione acquosa. In alcuni casi, per ottenere una completa dissoluzione del composto, è necessario procedere a una sonicazione della soluzione utilizzando un sonicatore a bagno d'acqua per circa 30 s. Le soluzioni devono essere preparate immediatamente prima dell'uso.

C) Soluzione bloccante.

Glicina/NaCl/NaOH (glicina 0,2 mol/L; NaCl 0,125 mol/L; pH 10,75).

D) Soluzione standard di 4-MU (1 mmol/L).

Le soluzioni dei tamponi (A) possono essere conservate a +4 °C; in queste condizioni sono stabili per circa 30 giorni. La soluzione di substrato (B) deve essere preparata in occasione di ogni serie di determinazioni e può essere conservata a +4 °C per 5-6 ore dopo il suo allestimento e prima dell'utilizzo. La soluzione bloccante (C) è stabile a temperatura ambiente per un periodo di circa 6 mesi. La soluzione standard (D) può essere conservata a -20 °C fino ad un anno.

Procedimento

Allestimento delle miscele di incubazione

La composizione delle miscele di incubazione è rias-

sunta nella Tabella 3. Per ogni campione deve essere contemporaneamente allestita la corrispondente prova in bianco nella quale il materiale biologico (omogenato di fibroblasti o suo supernatante, o liquido di coltura) è sostituito da un ugual volume di acqua bidistillata. In qualche caso, come sarà precisato più avanti, è necessario allestire il "bianco dell'enzima" in cui il campione, incubato a parte per un ugual tempo, è aggiunto alla miscela di incubazione immediatamente prima dell'aggiunta di glicina. Per l'azzeramento preliminare del fluorimetro deve essere preparato un "bianco fluorimetrico" costituito da 250 µL di acqua bidistillata e da 750 µL della soluzione bloccante.

Curva di taratura

Diluire 10 volte la soluzione standard (D) con acqua bidistillata e pipettare quantità variabili da 5 µL (0,5 nmol) a 100 µL (10 nmol). Portare in ogni provetta il volume a 250 µL con acqua bidistillata, indi aggiungere 750 µL della soluzione bloccante (C), agitare energicamente e misurare la fluorescenza. Riportare i dati ottenuti in grafico ponendo in ordinate i valori di fluorescenza espressi in unità arbitrarie e in ascisse le quantità di 4-MU espresse in nmol.

Standard interno

La curva di taratura è allestita in occasione di verifiche strumentali. Per ogni serie di determinazione è consigliabile allestire uno standard interno, la cui concentrazione è scelta in base all'attività media dell'enzima misurato (Tabella 3). Poiché i 4-MU derivati alle concentrazioni usate posseggono una leggera ma non trascurabile fluorescenza che interferisce nel dosaggio del 4-MU, allo scopo di assicurare la massima accuratezza del dosaggio, lo

Tabella 3

Schema del procedimento per la determinazione fluorimetrica delle glicoidrolasi

Componente della miscela	Campione	Bianco (substrato)	Standard interno
Soluzione tampone	25 µL	25 µL	25 µL
Soluzione di substrato	175 µL	175 µL	175 µL
Campione	50 µL	---	---
Acqua distillata	---	50 µL	25 µL
Standard di metilumbelliferone (4-MU)*	---	---	25 µL
	Agitare, incubare a 37 °C per il tempo stabilito		Agitare
Soluzione bloccante	750 µL	750 µL	750 µL
	Agitare energicamente e misurare la fluorescenza (eccitazione 365 nm, emissione 452 nm) entro un'ora		

*Soluzione di 4-MU 1 mmol/L diluita 1:10 (contenente 2,5 nmol di 4-MU in 25 mL) oppure 1:100 (contenente 0,25 nmol di 4-MU in 25 mL) per elevate o ridotte attività enzimatiche, rispettivamente.

standard interno deve anche contenere, oltre al 4-MU, la soluzione del substrato e la soluzione del tampone.

Calcolo dell'attività

Esprimere l'attività enzimatica in Unità Internazionali è il modo più frequentemente utilizzato (U: $\mu\text{mol}/\text{min}$): essa può essere riferita a L di medium di coltura o a g di proteine di omogenato di fibroblasti, a seconda delle esigenze. La formula semplificata per il calcolo dell'attività enzimatica è:

$$\frac{\Delta F_c}{\Delta t} \times \frac{cs}{\Delta F_s} \times \frac{1000}{q} \times fd = U/L \text{ o } /g \text{ proteine}$$

dove:

Fc = lettura di fluorescenza corretta del valore del bianco per il campione.

Fs = lettura di fluorescenza corretta del valore del bianco per lo standard interno.

cs = concentrazione dello standard interno in μmol .

t = tempo di incubazione in min.

q = quantità di materiale biologico (mL di liquido biologico o mg di proteine).

fd = fattore di diluizione (solo nei casi in cui è necessario una diluizione del campione).

In alcune situazioni è utile calcolare l'attività enzimatica riferendola al milione di cellule o per μg di DNA utilizzando le seguenti formule:

$$\frac{\Delta F_c}{\Delta t} \times \frac{cs}{\Delta F_s} \times \frac{10^6}{n. \text{ cellule}} = \text{mU}/10^6 \text{ cellule}$$

$$\frac{\Delta F_c}{\Delta t} \times \frac{cs}{\Delta F_s} \times \frac{1}{\mu\text{g DNA}} = \text{mU}/\mu\text{g DNA}$$

Materiale di controllo e di calibrazione

Avere un materiale di controllo è importante, in particolare, quando si desidera costruire degli intervalli di riferimento utili per l'individuazione dei soggetti eterozigoti. In questo caso è molto importante l'attendibilità delle misurazioni, che è possibile ottenere mettendo il metodo di determinazione sotto controllo utilizzando materiale biologico (fibroblasti e medium di coltura) reso stabile (10). Un tale materiale non è attualmente disponibile in commercio, ma può essere preparato come segue:

- alla preparazione di fibroblasti o al loro medium di coltura si aggiunge glicole etilenico (30% concentrazione finale);
- agitare vigorosamente per circa un'ora a 4° C;
- suddividere il materiale di controllo in piccole aliquote (circa 0,5 mL) e mantenere ad una temperatura tra -10 e -20° C. In queste condizioni le attività enzimatiche sono stabili per circa un anno.

Misurazione di attività enzimatiche con substrati naturali radioattivi

Riportiamo qui le modalità per la misurazione di due attività enzimatiche lisosomiali.

Determinazione dell'attività della β -esosaminidasi

L'attività enzimatica viene valutata utilizzando il [^3H] GM2 come substrato (11). La determinazione viene effettuata utilizzando 100 μg di proteine cellulari (omogeneizzate in H_2O) in un volume finale di 50 μL di tampone citrato 10 mM pH 4,2, contenente 0,1% di albumina bovina, 25 μg di attivatore proteico del GM2 (14), 13 μg di sodio taurodeossicolato e 10.000 dpm di [^3H] GM2 diluito in 3 μg di GM2 freddo. La miscela di reazione viene mantenuta a 37 °C sotto agitazione per 12 ore. Al termine, vengono aggiunti 4 volumi di tetraidrofurano, la miscela viene centrifugata e il supernatante analizzato. La radioattività associata ai singoli componenti lipidici (GM2 e GM3) separati mediante cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione [sistema solvente: cloroformio/metanolo/ CaCl_2 0,2%, 55:45:10 (v/v/v)] viene quantificata mediante autoradiografia digitale (β Imager 2000 Instrument, Biospace).

Determinazione dell'attività della sialidasi lisosomiale

L'attività enzimatica viene valutata utilizzando il [^3H] GM3 come substrato. La determinazione viene effettuato utilizzando 10-30 μg di proteine cellulari (omogeneizzate in H_2O) in un volume finale di 50 μL di tampone acetato 100 mM, NaCl 40 mM, contenente 0,04 mg di glicodeossicolato, 10.000 dpm di [^3H] GM3, 1,16 mg di GM3 freddo. La miscela di reazione viene mantenuta a 37 °C sotto agitazione per 45 min. Al termine, vengono aggiunti 4 volumi di tetraidrofurano, la miscela viene centrifugata e il supernatante analizzato. La radioattività associata ai singoli componenti lipidici, separati mediante cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione [sistema solvente: cloroformio/metanolo/ CaCl_2 0,2%, 55:45:10 (v/v/v)], viene quantificata mediante autoradiografia digitale.

APPROCCI SPERIMENTALI SU CELLULE VITALI: I TEST DI "LOADING/FEEDING"

I fibroblasti, che sono cellule vitali, consentono approcci sperimentali non praticabili con altre cellule (leucociti, linfociti, piastrine, ecc.). Tra questi figurano le prove che consistono nella somministrazione ai fibroblasti coltivati in vitro, direttamente nel medium di coltura, di precursori o prodotti radioattivi e nel rilevamento successivo della quantità di metaboliti formati. In particolare è possibile effettuare test di "loading", quando si somministrano il precursore metabolico radioattivo. In questo caso, dopo opportune incubazioni, eventualmente seguite da periodi di "chase" (durante il quale si rimuove il precursore radioattivo dal terreno per dar tempo alle cellule di metabolizzarlo) nelle cellule dovrà essere isolato e quantificato il prodotto di accumulo. Test di "feeding" si

effettuano invece quando ai fibroblasti si somministra lo stesso metabolita d'accumulo o una molecola ancora più a monte dello step metabolico coinvolto. In questo caso si rileverà la diminuzione o l'assenza dei prodotti catabolici a valle dell'interruzione metabolica, il che consente di identificare il deficit enzimatico in modo inequivocabile.

Effettuando questi esami è necessario adottare alcune precauzioni in modo da consentire una corretta interpretazione dei risultati. Innanzitutto la scelta del prodotto radioattivo da somministrare deve, ove possibile, orientarsi su composti isotopicamente marcati, in modo da evitare che l'ingombro sterico del gruppo recante la radioattività o il suo comportamento fisico-chimico in soluzione, differente dal metabolita endogeno, alterino di per sé il metabolismo cellulare. Occorre poi conoscere la cinetica di associazione ed internalizzazione del prodotto somministrato ed assicurarsi che arrivi integro alla sede subcellulare (in questo caso l'apparato lisosomale) dove si prevede si verifichi l'interruzione metabolica. Infine, occorre disporre di metodi sensibili e specifici per l'analisi dei metaboliti radioattivi di interesse, che possono essere minoritari.

Nei fibroblasti dei pazienti è frequente il riscontro di quantità di prodotti metabolici differenti da quelle attese sulla base dell'attività residua dell'enzima implicato. Ciò può essere dovuto al fatto che normalmente nelle misurazioni di attività enzimatica in vitro si adottano condizioni ottimali, che potrebbero consentire all'enzima di agire a velocità più elevate di quelle ottenibili sui fibroblasti mantenuti in coltura, dove è possibile la presenza di inibitori o la carenza di fattori protettivi. Di contro un'attività risultata molto bassa o assente nel corso della misurazione in vitro potrebbe rivelarsi sufficiente a degradare una certa quantità di substrato quando l'enzima si trovi all'interno delle cellule, per la presenza di elementi correttivi o l'intervento di altri enzimi. La conoscenza di questi fattori e la loro valutazione può quindi consentire una più corretta classificazione della patologia ed un miglior inquadramento clinico del paziente.

Applicazione del test di "feeding" alla diagnosi di GM2 gangliosidosi

Per lo studio delle malattie di Sandhoff e Tay-Sachs in cui la carenza dell'enzima β -esosaminidasi A provoca l'accumulo intralisosomale di un glicosfingolipide, il ganglioside GM2, in particolar modo nelle cellule neuronali, si è dimostrato di estrema utilità il test di "feeding".

Gli sfingolipidi sono componenti ubiquitari delle membrane degli organismi eucariotici, ma le membrane delle cellule nervose ne sono particolarmente ricche; le conseguenze dell'accumulo si riflettono quindi soprattutto sul sistema nervoso centrale, le cui cellule vanno incontro a uno scompenso funzionale che porta a progressiva e rapida neurodegenerazione.

L'esosaminidasi A è un eterodimero costituito da una subunità α e da una subunità β , codificate da due geni diversi rispettivamente localizzati sul cromosoma 15 e sul cromosoma 5. Nei tessuti dei mammiferi la β -esosaminidasi è presente in due forme: esosaminidasi A ($\alpha\beta$) e eso-

saminidasi B ($\beta\beta$). L'omodimero $\alpha\alpha$ (esosaminidasi S) rappresenta l'attività residua nei pazienti con malattia di Sandhoff, in cui il difetto coinvolge il gene per la subunità β . Difetti nel gene codificante la subunità α portano alla malattia di Tay-Sachs. In entrambe le patologie viene comunque a mancare l'esosaminidasi A (eterodimero $\alpha\beta$), che è l'unica forma attiva sui glicosfingolipidi acidi (gangliosidi). L'enzima è però attivo sul ganglioside GM2 solo in presenza di un attivatore proteico, la cui carenza geneticamente determinata porta, così come l'assenza dell'enzima stesso, ad una GM2 gangliosidosi. (Tabelle 4 e 5).

Per la diagnosi di accumulo, estremamente efficace e di semplice esecuzione è l'applicazione del test di "feeding" a fibroblasti in coltura derivanti dal soggetto portatore. La tecnica del "feeding" si è inoltre dimostrata estremamente utile in studi volti ad indagare l'efficacia di approcci terapeutici innovativi basati sulla correzione del difetto mediante trasferimento genico mediato da vettore (che consente l'inserimento del gene mancante nelle cellule mutate che saranno poi in grado di produrre l'enzima) e mediante la cross-correzione, basata sulla possibilità da parte delle cellule deficitarie di captare l'enzima secreto dalle cellule circostanti (13).

La tecnica di "feeding" si basa sulla somministrazione del ganglioside GM1 isotopicamente marcato sulla base a lunga catena (^3H GM1). Questo glicosfingolipide viene internalizzato dai fibroblasti in coltura provenienti da soggetti sani e catabolizzato a GM2, GM3, sfingolipidi neutri (Figura 3). Essendo la marcatura a livello della sfingosina tutti i prodotti catabolici risultano radioattivi e sono quindi identificabili. Il "pulse" (somministrazione in assenza di FCS) viene effettuato somministrando alle cellule (in piastre da 6 cm di diametro) per 5 ore una dose di ganglioside pari a 5×10^{-7} M in EMEM in assenza di siero fetale (il ganglioside viene essiccato sul fondo di una provetta e risospeso nell'opportuna quantità di terreno) ed è seguito da 15 ore di "chase" (incubazione delle cellule con terreno di coltura completo in presenza di FCS). Al termine di tali procedimenti si effettuano lavaggi successivi, si raccolgono le cellule in acqua e si analizzano per il loro contenuto in sfingolipidi radioattivi. A tale scopo si segue la seguente procedura: la sospensione cellulare viene centrifugata a 1000g a 4 °C per 10 min e il pellet viene sottoposto ad estrazione dei lipidi con il sistema tetraidrofurano/ H_2O , 4/1, ottenendo un pellet delipidizzato e un estratto lipidico totale (14). La radioattività associata ai singoli componenti lipidici separati mediante cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione viene quantificata mediante autoradiografia digitale.

Come si può vedere in Figura 4, nei fibroblasti di controllo il ganglioside GM1 viene trasformato in GM2, il quale viene poi ulteriormente catabolizzato, mentre nei fibroblasti Tay-Sachs il GM2 si accumula, ma, soprattutto, è evidente l'assenza di suoi prodotti catabolici, chiara dimostrazione di un blocco metabolico a suo carico. Lo stesso comportamento viene evidenziato in fibroblasti provenienti da soggetti con malattia di Sandhoff o con carenza di attivatore proteico (13).

Lo step diagnostico biochimico successivo deve poi

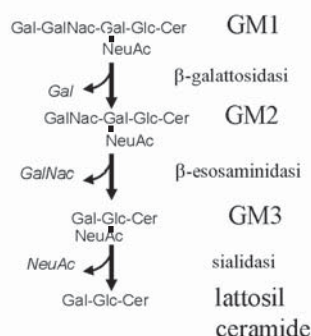
Tabella 4Attività delle diverse isoforme di β -esosaminidasi sui differenti substrati

Substrato	Esosaminidasi S	Esosaminidasi A	Esosaminidasi B
	$\alpha\alpha$	$\alpha\beta$	$\beta\beta$
Proteoglicani	+	+	+
Glicoproteine	-	+	+
Oligosaccaridi	-	+	+
Glicolipidi neutri	-	+	+
Gangliosidi	-	+	-
4-metilumbelliferil- β -N-acetilglucosaminide-6-solfato	+	+	-
4-metilumbelliferil- β -N-acetilglucosaminide	+	+	+

Tabella 5

Varianti di GM2 gangliosidosi

	Esosaminidasi S	Esosaminidasi A	Esosaminidasi B	GM ₂ attivatore proteico
Normale	+	+++	++	Si
Variante B (Tay-Sachs)	-	-	++	Si
Variante O (Sandhoff)	+	-	-	Si
Variante AB	+	+++	++	No

**Figura 3**

Rappresentazione schematica delle reazioni di idrolisi che subisce il ganglioside GM1 a livello lisosomiale.

essere mirato ad individuare lo specifico difetto e prevede l'applicazione di analisi finalizzate all'identificazione dell'isoforma carente.

Lo stesso approccio può essere utilizzato a scopi diagnostici per le altre malattie da accumulo lisosomiale, somministrando alle cellule l'opportuno substrato portante l'opportuna marcatura.

Applicazione del test di "feeding allo studio e alla diagnosi della malattia di Alzheimer

La deposizione intracellulare di proteine aberranti e glicoconjugati è comune a diverse patologie neurodegenerative, età-correlate, come la malattia di Alzheimer

**Figura 4**

Pattern dei gangliosidi radioattivi estratti dai fibroblasti in coltura dopo 5 ore di incubazione con il GM1 triziato seguite da 15 ore di "chase". I gangliosidi sono stati separati tramite cromatografia su strato sottile seguita da autoradiografia digitale. È mostrato un quadro rappresentativo ottenuto da due linee di fibroblasti normali (NF) e da una linea di fibroblasti di pazienti affetti da malattia di Tay-Sachs (TS).

(AD), la malattia di Huntington, la demenza frontotemporale e la malattia di Parkinson. Un altro aspetto che accomuna tali patologie è l'evidenza di "pathways" di alterato processamento proteico nei lisosomi (15). In particolare, nei cervelli di pazienti Alzheimer sono state messe in evidenza disfunzioni lisosomali, a loro volta implicate nella formazione di frammenti amiloidogenici della proteina precursore dell'amiloide (16). D'altra parte, studi in vivo (17) ed in vitro (18) hanno confermato che un disturbo lisosomiale, causato sperimentalmente, è in grado di determinare la produzione di peptidi amiloidogenici. C'è anche da considerare che alcune delle manifestazioni cliniche tipiche della AD, quali ad esempio il

progressivo declino cognitivo e l'inadeguatezza comportamentale, sono comuni alle tradizionali malattie d'accumulo lisosomali geneticamente determinate. Questi ed altri studi supportano quindi la considerazione che l'alterazione progressiva della funzione lisosomale, osservata durante l'invecchiamento e l'AD, contribuisca in modo importante ai processi neurodegenerativi e suggeriscono che, per alcuni aspetti, essa sia accomunabile ad una forma di malattia d'accumulo lisosomale ad esordio tardivo (19,20). Non stupisce quindi che lo studio dell'attività lisosomale dei fibroblasti periferici AD possa essere considerato un approccio utile sia per approfondire gli aspetti patogenetici alla base della malattia, sia per prospettare possibili esami diagnostico/prognostici da adottare nei suoi confronti, tenendo conto del fatto che a tutt'oggi la diagnosi di certezza di AD può essere effettuata solo post-mortem e con indagini a livello cerebrale, e che non esistono marcatori periferici in grado di predirne l'evoluzione.

La tecnica del test di "feeding" con gangliosidi radioattivi può quindi essere applicata a fibroblasti in coltura derivanti da soggetti AD. La tecnica si basa in questo caso sulla somministrazione del ganglioside GM1 isotopicamente marcato sulla base a lunga catena ($[^3\text{H}]$ GM1) nel terreno di coltura dei fibroblasti per un periodo di "pulse" di 16 ore (23), mentre per la restante parte dell'approccio analitico si rimanda a quanto descritto precedentemente. Come si può vedere in Figura 5, la produzione di GM2 e GM3 triaziati è significativamente maggiore nei fibroblasti AD rispetto ai controlli.

Anche l'attività della β -D-galattosidasi, responsabile dell'idrolisi del GM1 a GM2, misurata in vitro su lisati cellulari, risulta aumentata nei fibroblasti AD rispetto ai controlli, indicando la presenza di una disfunzione opposta a quella presente nelle lisosomopatie geneticamente determinate, ma potenzialmente altrettanto dannosa. Infatti, benché le informazioni riguardo il metabolismo dei glicosfingolipidi nell'AD siano alquanto scarse, è stato riportato un aumento dei gangliosidi GM2 e GM3 nella corteccia parietale e frontale di cervelli di soggetti

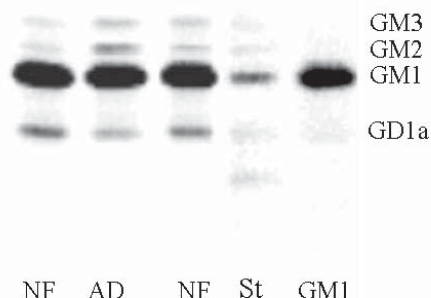


Figura 5

Pattern dei gangliosidi radioattivi estratti dai fibroblasti in coltura dopo 16 ore di incubazione con il GM1 triaziato. I gangliosidi sono stati separati tramite cromatografia su strato sottile seguita da autoradiografia digitale.

E' mostrato un quadro rappresentativo ottenuto da due linee di fibroblasti normali (NF) e da una linea di fibroblasti di pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD).

AD, mentre altri gangliosidi della serie ganglio risultavano ridotti nelle stesse aree (22). Questa accelerata degradazione dei gangliosidi potrebbe essere correlata all'evidenza di una proliferazione ed ingrandimento dei lisosomi riscontrata nei neuroni affetti da AD. Inoltre, sia nelle placche amiloidi che nel fluido cerebro-spinale di pazienti AD è stata rilevata un'aumentata presenza di enzimi lisosomali ed è stato suggerito che essi siano up-regolati come risposta compensatoria all'accumulo del peptide amiloide β (23).

E' interessante notare che l'aumento dell'idrolisi del ganglioside GM1 viene rilevato nei fibroblasti AD, che peraltro non subiscono alcun fenomeno degenerativo, come invece succede alla controparte centrale. Ciò suggerisce che l'alterazione metabolica, ancorché acquisita, sia collegata con la patogenesi della disfunzione cerebrale e non rappresenti un semplice epifenomeno. D'altra parte, e questo è vero in generale per le cellule in coltura, non possono neanche essere invocati, come causa del differente atteggiamento metabolico nei confronti del ganglioside GM1 esogeno, eventuali fattori farmacologici o nutrizionali, dato che durante il tempo in coltura essi sarebbero diluiti migliaia di volte.

Tali risultati indicano che un'alterazione del metabolismo glicolipidico è sistemica nell'AD e l'aumentata idrolisi dei gangliosidi può essere considerata un nuovo segno distintivo di tale patologia.

Un altro dato interessante riguarda la correlazione fra l'aumentata produzione di GM2 e la severità della demenza, espressa come punteggio MMSE ("mini mental score examination"): ciò potrebbe indicare che una progressiva alterazione del metabolismo dei gangliosidi in periferia proceda di pari passo con lo sviluppo del deterioramento a livello centrale e potrebbe suggerire quindi di utilizzare tale esame per monitorare la progressione dell'AD, con un significato prognostico oltre che diagnostico.

BIBLIOGRAFIA

1. Sciannamblo M, Chigorno V, Passi A, et al. Changes of the ganglioside pattern and content in human fibroblasts by high density cell population subculture progression, *Glycoconjugate J* 2003;19:181-6.
2. Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 2002;3:122-31.
3. Sabatini DD, Adesnik MB. The biogenesis of membranes and organelles. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995:459-554.
4. Galjaard H. Genetic metabolic diseases; early diagnosis and prenatal analysis. Amsterdam: Elsevier North Olland, 1980.
5. Sandhoff K, Harzer K, Furst W. Lysosomal enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995:2427-42.
6. Brady RO. Sphingolipidoses. *Ann Rev Biochem* 1978; 47:687-713.
7. Sly WS, Natowicz M, Gonzales-Noriega A, et al. The role of the mannose-6-phosphate recognition marker and its receptor in the uptake and intracellular transport of lysosomal enzymes. In: Callahan JW, Lowden JA, eds.

- Lysosomes and lysosomal storage diseases. New York: Raven Press 1981;13:1-146.
8. Kornfeld S, Sly WS. I-Cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: Scriver CR, Beaudet AR, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed, New York: McGrawHill, 2001:3469-82.
 9. Callahan JW, Lowden JA. *Lysosomes and lysosomal storage diseases*. New York: Raven Press, 1981.
 10. Goi G, Besozzi M, Bairati C, et al. Preparation of a stable liquid material for calibration and quality control for lysosomal enzymes in plasma. I. Assay of enzymes of lysosomal origin in plasma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;230:595-8.
 11. Sonnino S, Nicolini M, Chigorno V. Preparation of radio-labeled gangliosides. *Glycobiology* 1996;6:479-87.
 12. Wu YY, Locker JM, Sujiyama E, et al. Expression and specificity of human GM2 activator protein. *J Biol Chem* 1994;269:16276-83.
 13. Arfi A, Bourgoin C, Basso L, et al. Bicistronic lentiviral vector corrects beta-hexosaminidase deficiency in transduced and cross-corrected human Sandhoff fibroblasts. *Neurobiol Dis* 2005;20:583-93.
 14. Tettamanti G, Bonali F, Marchesini S, et al. A new procedure for the extraction and purification of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 1973;296:160-70.
 15. Bahr BA, Bendiske J. The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *J Neurochem* 2002;83:481-9.
 16. Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res* 2000;25:1161-72.
 17. Hajimohammadreza I, Anderson VER, Cavanagh JB, et al. [beta]-Amyloid precursor protein fragments and lysosomal dense bodies are found in rat brain neurons after ventricular infusion of leupeptin. *Brain Res* 1994;640:25-32.
 18. Siman R, Mistretta S, Durkin JT, et al. Processing of the beta-amyloid precursor. Multiple proteases generate and degrade potentially amyloidogenic fragments. *J Biol Chem* 1993;268:16602-9.
 19. Adamec E, Mohan PS, Cataldo AM, et al. Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2000;100:663-75.
 20. Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, et al. Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and beta-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem* 2003;278:26687-94.
 21. Pitto M, Raimondo F, Zoia C, et al. Enhanced GM1 ganglioside catabolism in cultured fibroblasts from Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 2005;26:833-8.
 22. Kracun I, Kalanj S, Talan-Hranilovic J, et al. Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 1992;20:433-8.
 23. Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, et al. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* 1995;14:671-80.