

## Utilizzo dei fibroblasti in coltura nella diagnostica biochimica delle malattie metaboliche di origine genetica

Vanna Chigorno<sup>1</sup>, Marina Pitto<sup>2</sup>, Barbara Garavaglia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Chimica e Biochimica Medica

<sup>2</sup>Università degli Studi di Milano-Bicocca

<sup>3</sup>Divisione di Biochimica e Genetica, Istituto Nazionale Neurologico "C. Besta", Milano

*(Preparato per conto del Gruppo di Studio 04 "Colture cellulari in Biochimica Clinica")*

### ABSTRACT

#### The use of cultured fibroblasts for the biochemical diagnosis of inherited metabolic diseases

The main advantages deriving from the use of cultured fibroblasts for the biochemical diagnosis of inherited metabolic diseases are delineated. Then sampling, culturing and propagation techniques are described. Fibroblasts can be frozen in liquid nitrogen and successively re-plated and cultured, without undergoing metabolic modifications, this making possible the execution of comparative metabolic studies on viable cells. Furthermore, the use of these cells for the biochemical diagnosis of two major families of inherited diseases, that is lysosomal storage disorders and mitochondrial disorders, is described and the specific techniques for their recognition, principally using radioactive substrates, are summarized. We finally describe a recently optimized approach for the diagnosis of a disorder characterized by the deficiency of a lysosomal protein carrier.

### RIASSUNTO

Vengono evidenziati i vantaggi derivanti dall'utilizzo dei fibroblasti in coltura nella diagnostica biochimica delle malattie metaboliche di origine genetica. Vengono quindi descritte le modalità di prelievo, di coltivazione e di propagazione dei fibroblasti. Essi possono essere congelati in azoto liquido e poi posti nuovamente in coltura per un tempo pressoché illimitato, senza subire modificazioni metaboliche, rendendo possibile l'esecuzione di studi metabolici comparativi su cellule vitali, a distanza di tempo ed in laboratori differenti. Viene poi fornita una panoramica sull'utilizzo di queste cellule nella diagnostica biochimica di due importanti categorie di disordini geneticamente determinati, cioè le malattie d'accumulo lisosomali e le malattie mitocondriali, e vengono elencate le tecniche d'indagine specifiche, per lo più facenti uso di substrati radiomarcanti, utilizzabili per il riconoscimento di tali patologie. A scopo esemplificativo viene infine descritto l'approccio recentemente ottimizzato su fibroblasti in coltura per la diagnostica di una malattia caratterizzata dalla carenza di una proteina lisosomale di trasporto.

### 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 generico. 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 molte 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. E' possibile, inoltre, il trasporto da un laboratorio all'altro ed ottenere notevoli quantità di materiale, data la elevata velocità di riproduzione dei fibroblasti, che si rinnova per molti passaggi subcolturali (10-12) 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 di 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.

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 mm 5. 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 biotipico 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 CO<sub>2</sub> 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 2 volte alla settimana, sostituendolo con EMEM contenente il 10% di 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.

### **I fibroblasti in coltura nella diagnostica delle malattie lisosomiali**

I lisosomi sono gli organelli deputati, nella cellula, 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 seriche. Sono fondamentalmente costituiti da una membrana che racchiude uno spazio interno, il lisosol, caratteristicamente 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. 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 lisosomiali**

Le malattie d'accumulo lisosomiali 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 costituiscono l'1-5% dei disordini congeniti che, a loro volta, hanno nei nati vivi un'incidenza del 4-6% (1). Per un approfondimento della storia naturale degli enzimi lisosomiali e delle patologie genetiche ad essi correlate si rimanda a quanto riportato in letteratura (2-3). Esse sono il risultato della incapacità genetica di esprimere adeguatamente la struttura o 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 lisosomiale 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 carenza di attività di un enzima lisosomiale. 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 (4). Infine l'assenza o l'anomalo funzionamento di "carriers" di membrana addetti all'efflusso di cataboliti formati all'interno dei lisosomi può generare accumulo lisosomale, come nell'esempio sottocitato.

### Il test di loading/feeding

Nella diagnostica biochimica delle malattie genetiche lisosomiali gli approcci utilizzati con i fibroblasti sono, in linea generale, simili a quelli impiegati con le altre cellule. L'accertamento diretto del deficit enzimatico specifico, effettuato attraverso l'impiego di procedimenti ottimizzati di dosaggio enzimatico, è l'approccio di più generale applicazione. Questi procedimenti utilizzano substrati artificiali o naturali cromogenici, fluorogenici, o radioattivi, con metodiche rispettivamente colorimetriche, fluorimetriche o radiochimiche (5). I fibroblasti, che sono cellule vitali, consentono però ulteriori approcci sperimentali, non praticabili con altre cellule (leucociti, linfociti, piastrine, ecc.). Tra questi figurano i test 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 a) *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. b) *test di feeding*, quando ai fibroblasti si somministra lo stesso metabolita d'accumulo: 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 test occorre 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 od il suo comporta-

mento 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.

È frequente il riscontro, nei fibroblasti dei pazienti, 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, nel dosaggio dell'attività enzimatica "in vitro" si adottano condizioni ottimali, che potrebbero consentire all'enzima di lavorare a velocità più elevate di quelle ottenibili sui fibroblasti mantenuti in coltura, per la presenza, ad esempio, di inibitori o per carenza di fattori protettivi. Di contro un'attività risultata molto bassa o assente dopo dosaggio 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.

### La diagnostica Biochimico Clinica della Malattia di Salla

Come esempio di utilizzo della tecnica del feeding test, trattiamo qui dell'approccio recentemente ottimizzato per la diagnostica della malattia di Salla, dal nome della regione finlandese in cui è stato registrato il maggior numero di casi clinici. Tale patologia è caratterizzata da un accumulo di acido sialico a livello dei lisosomi di diversi tessuti e da un'aumentata escrezione urinaria dell'acido sialico stesso. Il quadro clinico della malattia è descritto in letteratura (6).

In realtà sono riconosciuti numerosi disordini caratterizzati da accumulo di acido sialico, a diversa eziologia, classificati come da Tabella 1.

A differenza della maggior parte delle malattie lisosomiali, nella malattia di Salla (e nell'ISSD= Infantile Sialic acid Storage Disease, che è la forma infantile più grave del Salla, presentando precoci alterazioni neurologiche e morte entro i primi anni di vita) la proteina interessata non è un enzima, bensì la proteina deputata al trasporto del-

**TABELLA 1**  
Classificazione delle SASD (Sialic Acid Storage Disorders)

Disordine	Forma di sialico depositato	Sede	Alterazione biochimica
Sialuria	Libera	citosol	UDP-GlcNac-2-epimerasi
Salla	Libera	lisosoma	alterazione del trasporto
ISSD	Libera	lisosoma	alterazione del trasporto
Sialidosi	Legata	lisosoma	deficit di sialidasi
Galattosialidosi	Legata	lisosoma	deficit di sialidasi e $\beta$ -galattosidasi

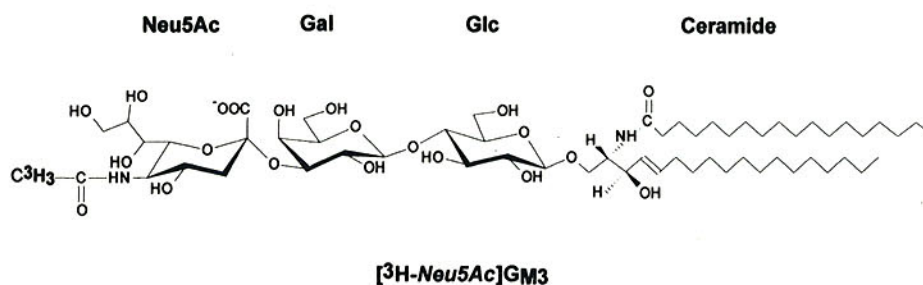
l'acido sialico dai lisosomi (ove viene rilasciato dai processi digestivi operati dalle idrolasi lisosomiali sui sialocongiugati) al citoplasma. Nel citoplasma l'acido sialico viene recuperato in modo quasi totalitario e riciclato per la sintesi di nuovi sialocongiugati (sialoproteine e sialolipidi). La diretta conseguenza di questa alterazione è una diminuita disponibilità di acido sialico nel citoplasma delle cellule per la biosintesi di sialoglicocongiugati.

La diagnosi di entrambi i fenotipi, Salla e ISSD, si basa essenzialmente su 3 momenti: il corretto inquadramento clinico, il riscontro di un'aumentata escrezione urinaria di acido sialico libero e l'osservazione di accumulo intralisosomale in vari tipi di cellule e tessuti. Il quadro clinico ISSD, grazie alla precocità, evidenza e rapida progressione dei segni che lo contraddistinguono, indirizza facilmente la diagnosi alle malattie lisosomiali; per contro, nella malattia di Salla, la progressione lenta delle manifestazioni cliniche e la possibile espressione di quadri sfumati spesso misconosce la diagnosi specifica. Il riscontro di aumentata escrezione urinaria di acido sialico libero è suggestivo per la diagnosi anche se a) lo stesso reperto si può verificare occasionalmente in neonati sani, b) nel Salla può non essere così significativamente elevato c) è comune alla sialidosi, alla galattosialidosi e alla sialuria. In quest'ultimo particolare disordine ereditario l'alterazione è a carico dell'enzima citoplasmatico UDP-N acetilglucosamina 2 epimerasi che perde la sensibilità al feed back negativo operato dal CMP-sialico. Il deposito di acido sialico a livello lisosomale è evidenziato dall'osservazione al microscopio elettronico di fibrociti, da biopsie cutanee e congiuntivali, presentanti lisosomi aumentati di volume e vacuolati. Mentre nei bambini ISSD questo aspetto è costantemente presente, nei soggetti Salla particolarmente giovani lo stesso può non essere evidenziabile. Bisogna comunque considerare che la morfologia dei lisosomi nelle malattie da accumulo di sialico è però simile a quella presentata dai soggetti affetti da altre patologie da accumulo. Va inoltre ricordato che il quadro clinico stesso delle SASD risulta, per più aspetti, sovrapponibile. La corretta discriminazione diagnostica fra le diverse entità cliniche che si presentano con accumulo intracellulare ed ipersecrezione urinaria di acido sialico è posta sulla base della differente natura dell'accumulo di acido sialico, cioè se libero - derivante da eccessiva sintesi o da mancato utilizzo per sequestro intralisosomale - o legato ai sialocongiugati.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo seguito un approccio sperimentale che si basa sulla somministra-

zione di un sialocongiugato radioattivo, il ganglioside GM3, isotopicamente marcato con trizio (7) a livello dell'acido sialico (Figura I), a fibroblasti in coltura provenienti da un soggetto portatore di malattia di Salla e a fibroblasti di controllo, a confluenza in piastre Petri da 100mm di diametro. Questa molecola è stata scelta in quanto nei fibroblasti, il ganglioside GM3 è il più abbondante e presente in un rapporto di circa 2,2:1 rispetto al ganglioside GD3, pure presente in queste cellule; la marcatura sull'acido sialico consente di seguirne il riciclo, una volta liberatosi dal catabolismo del ganglioside, per la sintesi di nuovi sialolipidi o sialoproteine. Il "pulse" (somministrazione in assenza di FCS) viene effettuato somministrando alle cellule per 5 ore una dose di ganglioside pari a  $4 \times 10^{-7} M$  (2,3 Ci/mMol) in EMEM in assenza di siero fetale ed è seguito da 72 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 e si analizzano per il loro contenuto in acido sialico libero, sialoproteine e sialolipidi radioattivi. A tale scopo si segue la seguente procedura: la sospensione cellulare viene sottoposta a due cicli di congelamento e scongelamento e quindi centrifugata a 100000g in modo da separare il materiale solubile dal materiale particolato. Una piccola quota di surnatante è poi prelevata per l'analisi dell'acido sialico libero e il rimanente, compreso il pellet, viene congelato e liofilizzato. Il residuo secco è sottoposto ad estrazione dei lipidi con tetraidrofurano/acqua 4:1 (v/v/v) (8) ottenendo un pellet delipidizzato e un estratto lipidico totale. La radioattività associata all'omogenato cellulare, all'acido sialico, alle proteine (pellet delipidizzato) e ai lipidi viene determinata mediante conteggio in scintillazione liquida. La radioattività associata ai singoli componenti lipidici e all'acido sialico, separati mediante cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione (sistema solvente: cloroformio/metanolo/CaCl<sub>2</sub> 0,2%, 50:42:11 (v/v)), viene analizzata mediante fluorografia o quantificata mediante autoradiografia digitale (DAR, Berthold, Germania).

Dopo il feeding con il ganglioside [<sup>3</sup>H-Neu5Ac]GM3 la radioattività era presente, oltre che a livello del ganglioside GM3, a livello dell'acido sialico, del pellet proteico (sialoglicoproteine) e del ganglioside GD3. Come si può vedere in Figura II nei fibroblasti di controllo l'acido sialico libero radioattivo non era apprezzabile, in contrasto con il notevole accumulo riscontrabile nei fibroblasti dei soggetti Salla (circa l'11% della radioattività totale incorporata). Al



**FIGURA I**  
Formula di struttura del [<sup>3</sup>H-Neu5Ac]GM3

contrario la radioattività associata alle sialoproteine e al ganglioside GD3, espressione del riciclo dell'acido sialico liberatosi dai lisosomi in seguito al processamento del ganglioside [ $^3\text{H}$ ] GM3, nei fibroblasti Salla era circa la metà rispetto ai normali, a conferma di un intrappolamento dell'acido sialico nei lisosomi che ne impedisce il riciclo a scopi biosintetici. In entrambe le linee cellulari la quantità di acqua triziata liberatasi da un catabolismo terminale dell'acido sialico era esigua, indicando un recupero quasi totale dell'acido sialico liberato, e l'analisi dei singoli lipidi ha inoltre dimostrato un'alterazione globale delle capacità metaboliche delle cellule Salla specificamente attribuibile ad una inadeguata funzionalità lisosomiale (9).

Possiamo affermare quindi che l'approccio sperimentale da noi seguito ha dimostrato di avere un'elevata potenzialità anche per la diagnosi biochimica di una malattia da accumulo in cui l'alterazione è a carico di una proteina di trasporto e non di un'enzima. Infatti sia l'accumulo di acido sialico radioattivo che la diminuita sintesi di nuovi sialoconjugati sono risultati di inequivocabile interpretazione e sono ottenibili con una procedura relativamente poco indaginosa e in tempi accettabili.

### I fibroblasti in coltura nella diagnostica delle malattie mitocondriali

I mitocondri sono organelli citoplasmatici a doppia membrana deputati alla respirazione cellulare, che avviene mediante il processo di fosforilazione ossidativa (OXPHOS) ad opera degli enzimi della catena respiratoria (complesso I, II, III, IV o citocromo C-ossidasi, V o ATP-sintetasi). Tali proteine sono codificate da geni appartenenti a due diversi sistemi genetici: il genoma nucleare, che codifica per la maggior parte delle proteine mitocondriali, ed il genoma mitocondriale, che codifica solo poche ma essenziali subunità dei complessi della catena respiratoria. Per un esauriente aggiornamento sui meccanismi molecolari del genoma mitocondriale si rimanda a (10). In

breve, ogni cellula contiene numerosi mitocondri, che possono essere decine (fibroblasti) o centinaia (epatociti) a seconda della funzione cellulare. Inoltre ogni mitocondrio contiene più copie di DNA mitocondriale (mitDNA). In natura sono molto frequenti mutazioni spontanee del mitDNA. Quando insorge una mutazione, le cellule inizialmente contengono una popolazione mista di mitDNA "wild-type" e mitDNA mutato (eteroplasmia). Durante la divisione mitotica delle cellule eteroplasmiche, i mitDNA "wild-type" e mutati vengono distribuiti in modo casuale alle cellule figlie; in questo modo, dopo diverse replicazioni, si può ottenere una popolazione omogenea (omoplasmica) di mitDNA "wild-type" o di mitDNA mutato. Se il contenuto di mitDNA mutato aumenta, la capacità ossidativa della cellula diminuisce in proporzione. Viene chiamato "effetto soglia" il contenuto minimo di mitDNA "wild-type" necessario per un corretto funzionamento cellulare e tissutale, al di sotto del quale si hanno le manifestazioni fenotipiche di malattia. Occorre inoltre tenere presente che la trasmissione del mitDNA è matrilineare. Infatti, durante la fecondazione, solo i mitocondri provenienti dal citoplasma dell'ovocita partecipano alla formazione dello zigote.

I due principali processi catabolici mitocondriali, che portano alla produzione degli equivalenti riducenti ( $\text{NADH}^+\text{H}^+$ ,  $\text{FADH}_2$ ) necessari per il processo di OXPHOS, sono il catabolismo dei carboidrati (piruvato) e degli acidi grassi.

### Le malattie mitocondriali

Le malattie mitocondriali comprendono sia malattie metaboliche caratterizzate da difetti di specifiche funzioni enzimatiche sia malattie con difetti enzimatici multipli, essenzialmente della catena respiratoria. Nelle tabelle 2 e 3 sono riportate le più comuni malattie mitocondriali ereditarie.

In conseguenza della differente rilevanza della funzione mitocondriale nei diversi tessuti, la patologia mitocondriale ha una maggiore espressione fenotipica nei tessuti

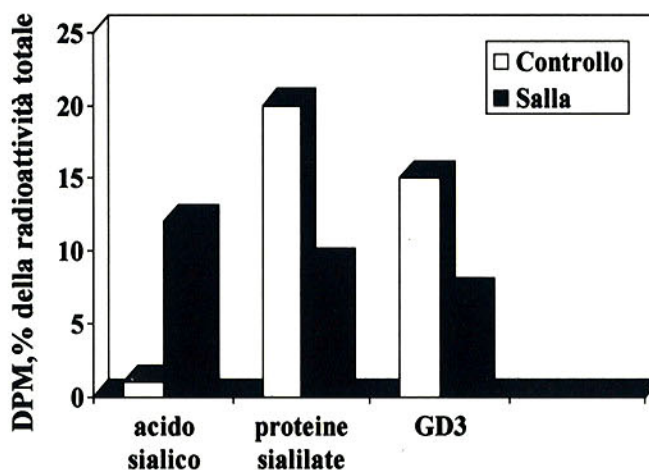


FIGURA II

Incorporazione di radioattività nell'acido sialico, nelle sialoproteine e nel GD3, dopo somministrazione ai fibroblasti di [ $^3\text{H}$ -Neu5Ac]GM3 per 15 ore, seguita da 72 ore di chase

che hanno sia un alto tasso di respirazione sia un basso tasso di rinnovamento cellulare (muscolo scheletrico, cuore, sistema nervoso centrale e periferico). E' chiaro, quindi, che questi tessuti sono elettivi per lo studio di queste patologie; l'utilizzo dei fibroblasti in coltura offre però il vantaggio di essere facilmente ottenibile da un prelievo biotico di cute, molto meno invasivo di una biopsia muscolare, dato molto importante tenendo presente che spesso i pazienti sono neonati.

Le metodiche e i mezzi di coltura usati sono quelli già descritti, tranne nel caso di sospetto difetto degli enzimi della catena respiratoria e, soprattutto, del DNA mitocondriale. In questo caso viene utilizzato un mezzo ad alto

contenuto di glucosio (F 14, Celbio - Italia) supplementato con 10% di siero fetale bovino, insulina, fattori di crescita (FGF ed EGF), uridina e piruvato. Queste supplementazioni sono necessarie per prevenire la selezione negativa dei mitocondri affetti da una ridotta capacità ossidativa (11). La diagnosi biochimica viene eseguita generalmente seguendo un protocollo che prevede l'utilizzo di:

- metodi indiretti
- metodi diretti
- metodi di approfondimento molecolare

**Metodi indiretti:** consentono di valutare su cellule intatte le capacità ossidative mitocondriali e vengono eseguite con fibroblasti in monostrato. Le più comuni metodi-

#### **TABELLA 2**

*Classificazione dei difetti mitocondriali nucleari*

##### **- Difetti di trasporto**

- difetto primario di carnitina (PCD)
- difetto di carnitina palmitoiltrasferasi I e II (CPT I e CPT II)
- difetto di carnitina-acilcarnitina traslocasi (CACT)

##### **- Difetti di utilizzo dei substrati**

###### **- piruvato**

- difetto del complesso della piruvato deidrogenasi (PDHc)
- difetto di piruvato carbossilasi
- difetti degli enzimi del ciclo di Krebs (fumarasi e  $\alpha$ -cheto-glutarato deidrogenasi)

###### **- acidi grassi**

- difetto di acilCoA deidrogenasi a catena molto lunga (VLCAD)
- difetto di acilCoA deidrogenasi a catena lunga (LCAD)
- difetto di proteina trifunzionale (MTP; LCHAD)
- difetto di acilCoA deidrogenasi a catena media (MCAD)
- difetto di acilCoA deidrogenasi a catena corta (SCAD)
- difetto di 3-OH acilCoA deidrogenasi a catena corta (SCHAD)
- aciduria glutarica tipo II da difetto di ETF
- aciduria glutarica tipo II da difetto di ETF-DH
- aciduria glutarica tipo II sensibile alla riboflavina

##### **- Difetti dei complessi della Catena Respiratoria**

- difetto di complesso I: NADH-ubichinone reduttasi
- difetto di complesso II: Succinato-ubichinone reduttasi
- difetto di complesso III: ubichinolo-citocromo c reduttasi
- difetto di complesso IV: citocromo c ossidasi
- difetto di complesso V: ATP sintetasi

#### **TABELLA 3**

*Classificazione dei difetti genetici del DNA mitocondriale*

##### **- Mutazioni puntiformi**

- neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON)
- sindrome di NARP (neuropatia, atassia, retinite pigmentosa)
- mioclonoepilessia con fibre ragged-red (MERRF)
- encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica e strokes (MELAS)
- miopatia mitocondriale e cardiomiopatia (MIMYCA)

##### **- Alterazioni quantitative del DNA mitocondriale (delezioni)**

##### **- Alterazioni qualitative del DNA mitocondriale (deplezioni)**

che prevedono l'uso di substrati radiomarcati. Utilizzando substrati marcati con  $^{14}\text{C}$  si misura la quantità di  $^{14}\text{CO}_2$  che si libera durante l'ossidazione. Per la valutazione dell'ossidazione degli acidi grassi a lunga, media e corta catena vengono usati rispettivamente  $[1-^{14}\text{C}]$  palmitato,  $[1-^{14}\text{C}]$  ottanoato e  $[1-^{14}\text{C}]$  butirato, mentre viene usato  $[1-^{14}\text{C}]$  piruvato e  $[1,4-^{14}\text{C}]$  succinato per indagare sia l'attività della piruvico deidrogenasi che l'attività degli enzimi del ciclo di Krebs e della catena respiratoria (12). Nei pazienti con difetti della  $\beta$ -ossidazione, questo metodo si è rivelato particolarmente sensibile quando il difetto enzimatico coinvolge i primi passaggi del ciclo  $\beta$ -ossidativo, risultando invece meno sensibile quando il difetto enzimatico si trova più a valle nella stessa via metabolica. In questi casi vengono usati il  $[9,10-^3\text{H}]$  palmitato e il  $[9,10-^3\text{H}]$  miristato misurando  $^3\text{H}_2\text{O}$  che si forma durante l'ossidazione (13). Essendo la marcatura in una posizione più distale rispetto ai substrati marcati con  $^{14}\text{C}$ , vengono richiesti più giri della spirale ossidativa prima che venga liberato il composto radiomarcato, formando, in caso di blocco metabolico, molti più composti intermedi che amplificano il segnale rispetto ai substrati marcati con  $^{14}\text{C}$ .

Il mancato utilizzo di un substrato ci permette di orientare lo studio enzimatico verso una precisa via metabolica (es. riduzione dell'ossidazione dell'acido ottanoico nei casi di difetto di acil-CoA deidrogenasi a media catena).

Un altro metodo indiretto è la misurazione della produzione di ATP, che valuta l'integrità e la funzionalità dei complessi della catena respiratoria. I fibroblasti, cresciuti in monostrato, vengono "permeabilizzati" con digitonina, che, legandosi al colesterolo della membrana plasmatica, consente il passaggio di substrati esogeni. I fibroblasti vengono quindi incubati con opportuni substrati, in questo caso non marcati, (piruvato, malato, ottanoato ecc.) che vengono metabolizzati dai sistemi enzimatici mitocondriali fino alla produzione di ATP (14). L'ATP prodotto viene dosato con un metodo spettrofotometrico. In base al substrato fornito è possibile valutare il flusso metabolico partendo da livelli differenti. Ad esempio fornendo come substrato il piruvato si ha produzione di ATP, se tutto il sistema è funzionante, dalla piruvico deidrogenasi all'ATP sintetasi, fornendo come substrato il malato si valuta il flusso dal ciclo di Krebs all'ATP sintetasi, e così via. Dal confronto della produzione di ATP con i differenti substrati è possibile identificare la presenza di un blocco metabolico.

**Metodi diretti:** sono le determinazioni dirette dell'attività di un enzima. Tutte le determinazioni vengono eseguite su omogenati di fibroblasti e la valutazione delle attività enzimatiche viene effettuata o con tecniche spettro/fluorometriche in cinetica o con tecniche radioattive. Tutte le metodiche utilizzate sono comunque complesse e comportano costose e lunghe preparazioni in laboratorio di substrati e cofattori non reperibili in commercio. Per esempio, l'analisi delle attività delle AcilCoA deidrogenasi prevede la purificazione della flavoproteina trasportatrice di elettroni (ETF) utilizzata nel dosaggio come accettore naturale di elettroni.

**Metodi di approfondimento:** una volta individuato il difetto enzimatico è possibile utilizzare i fibroblasti in col-

tura per eseguire studi di:

- ricerca di anomalie quantitative e/o qualitative della proteina coinvolta

- biosintesi e degradazione della proteina stessa.

A questo scopo è indispensabile avere gli anticorpi contro la proteina di interesse.

La ricerca di eventuali anomalie quantitative o qualitative viene effettuata con la tecnica ormai nota del western-blot. La preparazione dei campioni prevede l'estrazione delle proteine mitocondriali dai fibroblasti tramite omogeneizzazione con un tampone contenente Triton X-100 al 2% ed SDS 0,25%, seguita da centrifugazione a 100000xg. Data la scarsa quantità di mitocondri presente nei fibroblasti, la rilevazione viene effettuata con un metodo particolarmente sensibile in chemiluminescenza (ECL).

Lo studio della biosintesi e degradazione viene effettuato su fibroblasti in monostrato con la tecnica di "pulse/chase", descritta precedentemente per la malattia di Salla, utilizzando però  $^{35}\text{S}$ -Metionina. Al termine delle incubazioni i fibroblasti vengono tripsinizzati, lisati ed immunoprecipitati con l'anticorpo specifico. L'immunoprecipitato viene poi sottoposto a western-blot e la rivelazione viene effettuata mediante autoradiografia. La maggior parte delle proteine mitocondriali viene sintetizzata in forma di precursore citoplasmatico dotato di una sequenza "leader" (20-70 aminoacidi) indispensabile per la corretta destinazione cellulare. Utilizzando dei disaccoppianti della fosforilazione ossidativa (dinitrofenolo o rodamina 6G), che bloccano la traslocazione intramitocondriale, è possibile identificare, con lo stesso metodo descritto, anche la corretta sintesi dei precursori (15).

## CONCLUSIONI

Pensiamo di aver dato un quadro riassuntivo dei vantaggi offerti dall'impiego dei fibroblasti umani in coltura nella diagnostica biochimico-clinica delle malattie metaboliche di origine genetica. Concludiamo affermando che le metodiche da noi proposte, sebbene siano appannaggio di una diagnostica specialistica e non possono essere utilizzate di routine in ogni laboratorio d'analisi, costituiscono uno strumento di elevata potenzialità nell'ambito della medicina di laboratorio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Galjaard H. Genetic metabolic diseases: early diagnosis and prenatal analysis. Elsevier North Olland, Amsterdam, 1980.
2. Sabatini DD, Adesnik MB. The biogenesis of membranes and organelles. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill 1995;459-554.
3. Sandhoff K, Harzer K, Fürst W. Lysosomal enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill 1995;2427-2442.
4. Brady RO. Sphingolipidoses. Ann Rev Biochem 1978;47:687-713.

5. Callahan JW, Lowden JA. Lysosomes and lysosomal storage diseases. Raven Press, New York 1981.
6. Renlund M. Clinical and laboratory diagnosis of Salla disease in infancy and childhood. *J Pediatr* 1984;104:232-236.
7. Sonnino S, Nicolini M, Chigorno V. Preparation of radio-labeled gangliosides. *Glycobiology* 1996;6:479-487.
8. Tettamanti G, Bonali F, Marchesini S, Zambotti V. A new procedure for the extraction and purification of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 1973;296:160-170.
9. Chigorno V, Tettamanti G, Sonnino S. Metabolic processing of gangliosides by normal and Salla human fibroblasts in culture. A study performed by administering radioactive GM3 ganglioside. *J Biol Chem* 1996;271: 21738-21744.
10. Zeviani M, Tiranti V., Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine* 1998;77:59-72.
11. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. 1989;246:500-503.
12. Garavaglia B, Uziel G, Dworzak F, Carrara F, Di Donato S. Primary carnitine deficiency: heterozygote and intrafamilial phenotypic variation. *Neurology* 1991;41:1691-1693.
13. Moon A, Rhead WJ. Complementation analysis of fatty acid oxidation disorders. *J Clin Invest* 1987;79:59-64.
14. Dionisi Vici C, Seneca S, Zeviani M, Fariello G, et al. Fulminant Leigh syndrome and sudden unexpected death in a family with the T9176C mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:2-8.
15. Finocchiaro G, Colombo I, Garavaglia B, Gellera C, et al. cDNA cloning and mitochondrial import of the b-subunit of the human electron-transfer flavoprotein. *Eur J Biochem* 1993;213:1003-1008.