



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA  
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA

---

Genova, 14.05.19

**CREAZIONE DI MODELLI TRANSGENICI STABILI DI ZEBRAFISH PER LO STUDIO DELLA MALATTIA DI ALEXANDER E LORO CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE**

Dr. Tiziana Bachetti, PhD - Laboratorio di Neurobiologia dello Sviluppo, Università di Genova

Prof. Simona Candiani, Laboratorio di Neurobiologia dello Sviluppo, Università di Genova

Dr. Isabella Ceccherini, U.O.C. Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genova

**Introduzione, razionale e dati preliminari**

Mutazioni in eterozigosi nel gene *GFAP* sono responsabili della malattia di Alexander, una rara forma di malattia genetica neurodegenerativa in cui la proteina mutata glial acidic fibrillary protein (GFAP), marcatore degli astrociti, non è più in grado di conformarsi correttamente producendo quindi una cascata di eventi cellulari a valle che causa danno neuronale fino a neurodegenerazione.

La caratteristica evidente a livello anatomico in tutti i pazienti, sia quelli caratterizzati da forme di Tipo I (a esordio precoce e più gravi) sia quelli con forme di Tipo II (a esordio tardivo e meno severe) è la presenza di fibre di Rosenthal negli astrociti del sistema nervoso centrale. Queste inclusioni sono caratterizzate da accumuli di proteina GFAP mutata, da small heat shock proteins (sHSP27 e  $\alpha\beta$ -cristallina) e da componenti del sistema ubiquitina-proteasoma. Questa composizione delle fibre di Rosenthal è ben riprodotta da esperimenti su colture cellulari, in cui quando forme mutate di GFAP sono over-espresse, si vedono aggregati contenenti gli stessi componenti.

Le colture cellulari, per quanto utili per dare un'informazione immediata sull'effetto di una mutazione, soffrono del fatto che sono rappresentate da un unico tipo cellulare, situazione limitante per le malattie neurodegenerative nelle quali la patogenesi, indipendentemente dal gene mutato, non può prescindere dal cross-talk tra neuroni e componenti della glia.

A questo scopo, durante il progetto attualmente in via di conclusione, abbiamo provato a esprimere GFAP in un modello *in vivo* di vertebrato, zebrafish (*Danio rerio*), largamente utilizzato grazie alle sue numerose caratteristiche che lo rendono fruibile per questo tipo di studi: l'appartenenza alla classe dei vertebrati, il ciclo vitale rapido, la trasparenza nelle prime fasi dello sviluppo che permette di monitorare l'espressione *in vivo* di proteine marcate con fluorocromi, il relativo basso costo e la facilità di mantenimento rispetto ad altri modelli animali.

Nel caso della malattia di Alexander, l'elevata conservazione dei residui soggetti a mutazione lo rendono un possibile buon modello per la patologia (Nielsen&Jorgensen, 2003)

A questo scopo abbiamo utilizzato il sistema Tol2, già adottato in natura dagli zebrafish per la trasposizione di regioni cromosomiche durante lo sviluppo della linea germinale, per inserire la GFAP umana nel loro genoma.

Dagli esperimenti effettuati finora, come già descritto in dettaglio nel "Report di fine progetto\_2017", abbiamo osservato che il modello *in vivo* ben riproduce le osservazioni riportate da noi e da altri ottenute nei modelli cellulari. In particolare, la forma GFAP wild type (WT, corretta) genera pesci in cui GFAP forma nel 50% dei casi filamenti e nel 50% dei casi aggregati ben visibili (dato in accordo con l'over-espressione del gene, che anche se WT forma aggregati ma in quantità molto inferiore alle mutazioni). La forma mutata con la mutazione R239C si localizza nelle stesse regioni ma forma una gran quantità di aggregati, presenti nel 95% dei pesci.

Il costrutto privo di regione codificante di GFAP ma esprime il reporter verde GFP, la cui espressione è guidata dal promotore di *gfap*, mostra assenza di aggregati e una localizzazione coerente con quella attesa (Bernardos&Raymond, 2006). Abbiamo inoltre osservato che il ceftriaxone, già dimostrato avere benefici effetti *in vitro*, agisce anche *in vivo* rallentando/contrastando la formazione di aggregati. Questo inoltre non sembra dovuto a una diminuzione di espressione del gene *GFAP*, in quanto il trattamento non determina diminuzione di

fluorescenza nei pesci iniettati con il costrutto contenente solo il promotore di *gfap* a monte della GFP, ma privo della regione codificante la proteina.

### **Scopo del progetto**

Alla luce dei risultati preliminari ad oggi osservati, brevemente riassunti nei seguenti punti:

1. efficacia del metodo di trasposizione Tol2 per esprimere *in vivo* la proteina GFAP,
2. correttezza del profilo di espressione atteso,
3. riproducibilità dell'effetto patogenetico della mutazione p.R239C in termini di formazione di aggregati,
4. riproducibilità dell'effetto dell'antibiotico ceftriaxone nel contrastare gli aggregati di GFAP mutata,
5. produzione di zebrafish transgenici utilizzabili per incroci successivi per la produzione di linee pure stabili (in collaborazione con la Prof.ssa Michela Ori, Università di Pisa),

nella prosecuzione del progetto, argomento di un assegno di ricerca, proponiamo di approfondire i meccanismi molecolari degli effetti osservati.

In particolare:

1. effettuare le fasi successive di incroci tra animali per ottenere linee stabili WT e pR239C
2. effettuare analisi di espressione di small heat shock proteins e altri componenti cellulari in presenza di GFAP WT/mutata e in presenza o assenza di trattamento col ceftriaxone, mediante saggi di immunostochimica.
3. RNA-sequencing (possibilmente in modalità "single-cell") per confrontare il trascrittoma di cellule con GFAP WT e mutata

### **Rilevanza del progetto**

Questo progetto rappresenta l'evoluzione del precedente in termini di caratterizzazione molecolare del modello.

La produzione di linee stabili, attuabile in 8-12 mesi, dovrebbe fornire uno strumento per poter effettuare studi:

- a lungo termine, quali ad esempio l'effetto di farmaci, curve di sopravvivenza, analisi comportamentali
- screening di farmaci a scala più ampia

### **Referenze**

1. Bernardos RL, Raymond PA. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr Patterns*. 2006;6:1007-13.
2. Nielsen AL, Jørgensen AL. Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP. *Gene*. 2003 May 22;310:123-32

## **INFORMAZIONI AMMINISTRATIVE**

### **Data di inizio e durata del progetto**

L'importo della donazione è di € 28.557,00 oneri compresi.

La *data ufficiale di inizio* del progetto, argomento dell'assegno di ricerca che verrà bandito con questa donazione, prevediamo possa essere il 1 gennaio 2020.

La *durata* del progetto è 1 anno, con termine 31 dicembre 2020.

I primi 6-8 mesi saranno dedicati alla preparazione delle linee stabili e alla caratterizzazione molecolare del modello.

I mesi successivi saranno dedicati all'analisi di espressione e al confronto tra il trascrittoma di cellule che esprimono proteine GFAP wild type e mutata.

### **Personale coinvolto nel progetto**

Le unità in termini di laboratori coinvolti saranno due:

1. U.O.C. Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genova (dott.ssa Isabella Ceccherini)
2. Laboratorio di Neurobiologia dello Sviluppo, Università di Genova (prof.ssa Simona Candiani, dott.ssa Tiziana Bachetti, + assegnista di ricerca *to be named*)