



OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO
Sistema Sanitario Regione Liguria
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

TITOLO DEL PROGETTO: APPROFONDIMENTI SUI MECCANISMI PATOGENETICI ASSOCIATI ALLE MUTAZIONI NEL GENE *GFAP* PER IDENTIFICARE NUOVI BERSAGLI MOLECOLARI E BIOMARCATORI UTILI ALLA PROGnosi E ALLO SVILUPPO DI TERAPIE PER LA MALATTIA DI ALEXANDER COME MODELLO DI MALATTIA NEURODEGENERATIVA

Responsabile del progetto

Dr Tiziana Bachetti, UO Proteomica e Spettrometria di Massa, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

Collaboratori:

Dr.ssa Isabella Ceccherini, UOSD laboratorio di Genetica e Genomica delle Malattie Rare IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

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

Studi effettuati ad oggi

La malattia di Alexander (AxD, MIM#203450) è una rara malattia demielinizzante progressiva autosomica dominante delle cellule astrogliali causata da mutazioni eterozigoti nel gene che codifica per la proteina del filamento intermedio di tipo III, proteina acida fibrillare gliale (GFAP). I pazienti con AxD sono tutti caratterizzati da fibre Rosenthal all'interno di astrociti, inclusi GFAP mutante mal ripiegata, piccole proteine da shock termico e componenti del proteasoma. Sebbene non sia ancora disponibile una terapia approvata, di recente sono stati raggiunti grandi miglioramenti in questo campo grazie all'utilizzo in trial clinico oligonucleotidi antisenso volti a ridurre l'espressione di GFAP.

Oltre a numerosi studi in modelli *in vitro* che continuano ad essere effettuati, utili per valutare la patogenicità delle mutazioni (Bachetti et al, 2008) e per ricercare molecole efficaci nell'indurre una corretta organizzazione del GFAP (Bachetti et al, 2010, 2012, 2021), modelli animali sono stati sviluppati per approfondire la patogenesi dell'AxD. Recentemente in collaborazione con la prof.ssa Candiani è stato sviluppato un modello di zebrafish stabilmente esprimente nelle cellule gliali la mutazione del gene GFAP umano R239C, associata a fenotipi a esordio precoce (Candiani et al, 2020). Il modello si è rivelato responsivo al trattamento con ceftriaxone, rafforzando l'idea del suo possibile utilizzo per la validazione *in vivo* di farmaci e molecole che abbiamo già selezionato negli studi precedenti.

Studi in corso:

1. Attualmente, sul modello di zebrafish studi "omici" sono stati programmati per approfondire i meccanismi patogenetici della malattia di Alexander. Questi studi di trascrittomico (in corso, effettuato presso CSR4, Pula, Cagliari) e di proteomica (in programma al lab Proteomica e Spettrometria di Massa) produrranno dati che verranno validati sia *in vivo* sia sui modelli cellulari mediante approcci di analisi di espressione genica e analisi di pathways.

2. In collaborazione con l'Istituto Neurologico Carlo Besta, stiamo terminando gli studi sulla variabilità fenotipica associata a mutazioni che colpiscono lo stesso residuo amminoacidico, i cui risultati hanno rivelato un'utilità sia molecolare, identificando nuovi meccanismi patogenetici, sia clinica, fornendo informazioni utilizzabili per la prognosi della malattia.
3. Attualmente sono in corso collaborazioni con gli Istituti Gaslini, Besta e Buzzi mirate a pianificare studi per identificare biomarcatori (oggetto del progetto europeo EJP-RD 2022 in fase di preparazione).

Studi pianificati:

Gli studi che l'UO Proteomica e Spettrometria di Massa intende perseguire nei nell'ambito della malattia di Alexander vertono sull'approfondimento del *network* di interazioni della proteina GFAP nelle sue forme *wild type* e mutata con differenti forme di mutazioni e ricerca di molecole efficaci nel recupero funzionale di GFAP mutata.

In particolare, *in vivo* sul modello di zebrafish verranno studiati mediante approcci "omici", quali trascrittoma e proteomica, i pathways cellulari disregolati dalle mutazioni in termini di espressione genica e proteica; inoltre saranno studiate sia *in silico* mediante programmi di biologia computazionale, sia *in vitro* mediante saggi di biologia cellulare, le interazioni proteiche con le diverse forme di GFAP.

Risultati attesi:

Lo scopo di questi studi è quello di approfondire la conoscenza della patogenesi molecolare della malattia di Alexander, soprattutto al fine di distinguere i meccanismi alla base della neurodegenerazione del paziente pediatrico da quella dell'adulto, i cui risultati saranno utili anche per migliorare le conoscenze nell'ambito delle patologie neurodegenerative che più comunemente colpiscono la popolazione.

Referenze:

1. **Bachetti T**, Di Zanni E, Adamo A, Sechi MM, Solla P, **Ceccherini I** and Sechi GP. Beneficial effect of phenytoin and carbamazepine on GFAP gene expression and mutant GFAP folding in a cellular model of Alexander's disease. *Front Pharmacol.* 2021 Dec 7;12:723218
2. **Candiani S**, Carestiatto S, Mack AF, Bani D, Bozzo M, Obino V, Ori M, Rosamilia F, De Sarlo M, Pestarino M, **Ceccherini I**, **Bachetti T**. Alexander Disease Modeling in Zebrafish: An In Vivo System Suitable to Perform Drug Screening. *Genes (Basel).* 2020 ;11:149
3. **Bachetti T**, Di Zanni E, Balbi P, Ravazzolo R, Sechi GP, **Ceccherini I**. Beneficial effects of curcumin on gfap filament organization and down-regulation of gfap expression in an in vitro model of Alexander disease. *Exp Cell Res*, 2012, 318, 1844-54.
4. **Bachetti T**, Di Zanni E, Balbi P, Bocca P, Prigione I, Deiana GA, Rezzani A, **Ceccherini I**, Sechi G. In vitro treatments with ceftriaxone promote elimination of mutant glial fibrillary acidic protein and transcription down-regulation. *Exp Cell Res*, 2010, 316, 2152-2165.
5. **Bachetti T**, Caroli F, Bocca P, Prigione I, Balbi P, Biancheri R, Filocamo M, Mariotti C, Pareyson D, Ravazzolo R, **Ceccherini I**. Mild functional effects of a novel GFAP mutant allele identified in a familial case of adult onset Alexander disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2008, 16, 462-470.

Applicazioni dello strumento GloMax® Discover alla ricerca sulla malattia di Alexander

GloMax® Discover System della Promega è un lettore di piastre multifunzione per la quantificazione di luminescenza, fluorescenza, assorbanza UV-visibile, luminescenza filtrata in piastre da 6, 12, 24, 48, 96 e 384 pozzetti.

Nei diversi anni dedicati alla ricerca sulla malattia di Alexander, iniziata circa 15 anni fa nel laboratorio della dott.ssa Ceccherini all'IRCCS Gaslini di Genova e ora in corso anche all'Università e nell' U.O. Proteomica e Spettrometria di Massa all'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, abbiamo generato e messo a punto numerosi protocolli sperimentali che utilizzano, in colture cellulari di astrocitoma umano U251-MG, fluorescenza (in particolare GFP) e luminescenza (es. luciferasi di lucciola e renilla) come sistemi di monitoraggio della conformazione e dell'espressione della proteina GFAP.

Per esempio, abbiamo a disposizione plasmidi che contengono la regione regolatoria dell'espressione del gene GFAP a monte del gene luciferasi, sistema che permette mediante trasfezioni in cellule di monitorare l'attività del promotore in varie condizioni sperimentali (es. trattamento con farmaci, ruolo di fattori di trascrizione, effetto di varianti geniche, ecc).

Abbiamo inoltre messo a punto un sistema cellulare basato sull'espressione della proteina GFAP coniugata alla GFP che permette sia di valutare la sua conformazione mediante microscopia a fluorescenza, sia di quantificare i suoi livelli a seguito di diverse condizioni sperimentali (come per l'espressione: trattamento con farmaci, effetto di varianti geniche, ecc).

Tutti questi sistemi sono costantemente utilizzati a seconda dello scopo del lavoro.

Esistono inoltre saggi reporter per processi biologici quali i meccanismi responsabili dell'omeostasi proteica (sistema UPS, autofagia), coinvolti nel mantenimento dei livelli cellulari di GFAP, che usano la fluorescenza come segnale rivelatore e che possono essere analizzati con questo strumento.

Ultimamente sta per iniziare una collaborazione col dott. Federico Herrera per valutare il ruolo della E3 ubiquitina ligasi saccina nel pattern conformazionale di GFAP mutata, progetto per il quale verrà utilizzato lo strumento in oggetto per valutare l'attività del promotore di GFAP e i livelli di proteina GFAP mutata in cellule prive di saccina.