



MALATTIA DI ALEXANDER: IDENTIFICAZIONE DI POSSIBILI VARIANTI GENETICHE CAPACI DI MODIFICARE IL FENOTIPO CLINICO E LA PROGNOSI IN PAZIENTI PORTATORI DI UNA MUTAZIONE CAUSATIVA DEL GENE GFAP

Dssa Isabella Ceccherini
UOC Genetica Medica, IGG - Genova

Introduzione

La Malattia di Alexander (AxD) (MIM 203450) è una rara malattia neurodegenerativa caratterizzata da mutazioni in eterozigosi del gene Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) che inducono la produzione di proteine mal ripiegate, inclini ad aggregarsi e ad accumularsi negli astrociti (Fibre di Rosenthal - RFs). Tali inclusioni citoplasmatiche determinano una compromissione dei sistemi cellulari atti a smaltire proteine non corrette e dunque non funzionanti, quali il sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) e l'autofagia, inducendo ulteriore accumulo di proteine difettose. Sulla base di queste ed altre osservazioni, la trasmissione dominante della malattia di Alexander risulta causata da un guadagno piuttosto che da una perdita di funzione della proteina mutata, seguente al suo accumulo nel citoplasma.

Stesse mutazioni sono spesso associate a fenotipi marcatamente diversi di malattia AxD, suggerendo che i cambiamenti molecolari della proteina GFAP sono probabilmente necessari, ma non sufficienti a determinare un certo grado di severità dei sintomi clinici. Inoltre, è stato dimostrato il ruolo della regolazione genica di GFAP nella gravità del fenotipo, ossia i livelli di espressione dei due alleli GFAP selvatico (WT) e mutati potrebbero spiegare il diverso grado di gravità e l'età di esordio della malattia.

La regolazione della trascrizione di GFAP è stata al centro di numerosi studi e noi abbiamo già dimostrato che la presenza dell'allele variante del polimorfismo comune -250C/A (SNP rs2070935) determina un diverso livello di espressione GFAP [1], confermata dall'osservazione di un fenotipo più grave nel paziente in cui l'allele C era in *cis* (sullo stesso allele) rispetto alla mutazione GFAP rispetto ai pazienti in cui l'allele C dello stesso SNP si trovava in *trans* (sull'altro allele) rispetto alla mutazione GFAP [2].

Ciò suggerisce che i livelli relativi di proteine GFAP, errate o corrette che siano, all'interno di una cellula sono importanti per l'espressione e la funzione dell'allele corretto e possono influenzare l'esito cellulare. Inoltre, i livelli di proteina GFAP sono molto importanti per la formazione di aggregati, come testimoniato dall'osservazione che un aumento del 30% del contenuto totale GFAP è necessario e sufficiente per la formazione di aggregati e che la soglia per l'induzione di aggregati è abbassata in caso in cui vengono espresse proteine GFAP mutate.

Razionale

Nonostante la presenza di mutazioni GFAP tipiche, pazienti affetti da AxD mostrano una rimarchevole variabilità nelle manifestazioni fenotipiche. Questo suggerisce la presenza di fattori genetici, varianti rare o comuni sia del gene GFAP che di altri geni, in grado di modificare gli effetti genetici primari di AxD, presumibilmente mediante la regolazione dell'espressione di

GFAP. I meccanismi di tale regolazione dovrebbero dunque essere investigati, sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale, per identificare tutti quei fattori che possono modificare i livelli di espressione del gene GFAP e pertanto spiegare, una volta identificati e validati anche sperimentalmente, l'ampia variabilità fenotipica già dimostrata tra i pazienti AxD. L'esempio dello SNP del promotore di GFAP riportato sopra conferma la nostra ipotesi di lavoro: se la sovra-espressione di GFAP può promuovere la formazione di aggregati tossici, allora varianti comuni che influenzano il livello di espressione di GFAP possono potenzialmente modulare il fenotipo AxD. In tal caso, il genotipo a specifici loci polimorfici del gene GFAP potrà predire la gravità e/o l'età di insorgenza in pazienti portatori di mutazioni causative AxD. L'identificazione degli eventi trascrizionali o post-trascrizionali responsabili di tale modulazione fornirà anche nuovi bersagli genetici per lo sviluppo di possibili approcci terapeutici.

Risultati preliminari

Il gruppo proponente il presente progetto è coinvolto nello studio genetico e funzionale delle mutazioni GFAP dal 2004. In questo frattempo, nel Laboratorio della UOC Genetica Medica dell'Istituto Giannina Gaslini, si sono reclutati, allo scopo di una diagnosi molecolare, 198 pazienti sospetti AxD che sono stati sottoposti a sequenziamento di tutti gli esoni codificanti la principale isoforma (alfa) della proteina GFAP. In 67 di questi pazienti si è identificata una mutazione in eterozigosi del gene GFAP e si è dunque confermato il sospetto clinico-diagnostico. Questo ha permesso di avviare anche un ampio studio funzionale e di sviluppare una serie di specifici reagenti molecolari, coma da elenco seguente:

- a) valutazione funzionale degli effetti della mutazione complessa p.[R330G-E332K] del gene GFAP evidenziata in una forma adulta e familiare di AxD [3];
- b) studio dell'effetto della curcumina sugli aggregati di GFAP mutate associate a AxD [4];
- c) studio dell'effetto dell'antibiotico ceftriaxone nella risposta cellulare agli aggregati di proteine GFAP mutate [5];
- d) polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) del promotore di GFAP e loro ruolo nella regolazione dell'espressione di questo gene. In questo studio abbiamo dimostrato che i due alleli polimorfici di un marcatore situato a -250bp dall'inizio di trascrizione hanno effetti opposti sulla trans-attivazione del promotore di GFAP e dunque sui suoi livelli di espressione [1].

Scopo del progetto

Alla luce di quanto noto e di quanto già effettuato ad oggi nel nostro laboratorio (si vedano paragrafi precedenti), intendiamo con il presente progetto studiare i meccanismi molecolari che garantiscono la regolazione trascrizionale e quella post-trascrizionale, mai investigata finora, del gene GFAP, incluso il possibile ruolo di "small non-coding RNAs", piccoli trascritti non codificanti aventi ruolo regolatorio. In particolare, ci concentreremo sulla caratterizzazione delle regioni coinvolte nella sintesi dell'mRNA, splicing alternativo e stabilità del trascritto di GFAP. Inoltre, le varianti che identificheremo nelle regioni responsabili per la regolazione dell'espressione di GFAP saranno valutate per stabilire, a seguito di analisi di correlazione genotipo-fenotipo, se siano in grado di modificare l'insorgenza della malattia e il suo outcome, e pertanto in grado di predire la gravità e la prognosi nei pazienti AxD. In conclusione, i nostri scopi sono:

1. ricerca di varianti comuni e di varianti rare lungo l'intero locus GFAP nel nostro set di 67 pazienti AxD portatori di una mutazione causativa del gene GFAP. Anche un piccolo numero di pazienti negativi per mutazioni GFAP ma caratterizzati da un quadro tipico AxD saranno sottoposti a sequenziamento dell'intero locus GFAP. Questi obiettivi saranno realizzati

- mediante un approccio del tipo “Next Generation Sequencing” (NGS), seguito da identificazione di “Single Nucleotide Polymorphisms” (SNPs) localizzati in coincidenza di elementi regolatori, in grado dunque di influenzare il livello di espressione di GFAP avendo determinato una variazione della sequenza di un elemento regolatorio;
2. studio della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale per cercare elementi genetici funzionali che determinano la stabilità del trascritto, l’efficienza di traduzione e lo splicing alternativo del gene in un sistema cellulare in vitro già sviluppato nel nostro laboratorio. In particolare, intendiamo i) confermare il ruolo delle sequenze adiacenti all’inizio della trascrizione e che regolano il promotore basale, ii) identificare gli elementi di sequenza del 3’UTR del gene GFAP che possono modulare la stabilità dell’mRNA, iii) verificare la possibile interferenza delle varianti sinonime di GFAP con lo splicing del gene usando costrutti con minigeni. Infine, ricercheremo anche quei fattori di trascrizione e “small non-coding RNAs” (specialmente miRNAs) che possono modulare l’espressione di GFAP a seguito del loro legame con il promotore e con elementi specifici del 3’UTR.
 3. valutazione della correlazione tra dati genetici e dati clinico-neuroradiologici per identificare quei fattori genetici che possono predire l’insorgenza e la progressione della malattia. A questo riguardo, il presente obiettivo è da realizzarsi in stretta collaborazione con la Dssa Moroni ed il suo gruppo, presso l’Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano. Essi forniranno infatti tutti i dati clinici e neuroradiologici indispensabili per la correlazione genotipo-fenotipo e dunque per il riconoscimento delle varianti genetiche modificatrici. Allo scopo di validare le varianti così identificate, gli alleli varianti e selvatici degli SNP selezionati saranno analizzati sperimentalmente per dimostrare un loro possibile diverso effetto funzionale sulla espressione di GFAP, e per correlarlo ad un diverso outcome clinico. Infine, gli elementi genetici così identificati rappresenteranno anche potenziali bersagli contro cui disegnare una possibile terapia farmacologica atta a realizzare la diminuzione dell’espressione di GFAP.

Rilevanza del progetto

Ci proponiamo di identificare “modificatori” genetici in grado di modulare il fenotipo AxD in termini di gravità della sintomatologia ed età di insorgenza. Tali marcatori, una volta identificati, potranno essere utilizzati per la predizione della prognosi e per un possibile futuro bersagliamento terapeutico. Quanto proponiamo potrà offrire benefici nell’immediato ad alcuni pazienti mentre nel lungo periodo ci aspettiamo un miglioramento delle conoscenze su AxD che potrà facilitare ulteriori benefici.

1. Bachetti T, Di Zanni E, Lantieri F, et al. A Novel Polymorphic AP-1 Binding Element of the GFAP Promoter is Associated with Different Allelic Transcriptional Activities. *Ann Hum Genet*, 2010, 74, 506-515.
2. Yoshida T, Mizuta I, Saito K, et al. Effects of a polymorphism in the GFAP promoter on the age of onset and ambulatory disability in late-onset Alexander disease. *J Hum Genet*, 2013, 58, 635–638.
3. Bachetti T, Caroli F, Bocca P, et al. 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.
4. Bachetti T, Di Zanni E, Balbi P, Ravazzolo R, Sechi G, 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, 1844-1854
5. 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