

MODELLO DI ZEBRAFISH PER LA MALATTIA DI ALEXANDER: NUOVO SISTEMA PER STUDIARE LA PATOGENESI DELLE MUTAZIONI NEL GENE *GFAP* E PER IDENTIFICARE FARMACI POTENZIALMENTE EFFICACI NEL CONTRASTARE L'ACCUMULO DELLA PROTEINA *GFAP* MUTATA

PI: Dr. Tiziana Bachetti, PhD - U.O.C. Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini

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

Introduzione

Le mutazioni nel gene Glial Acidic Fibrillary Protein (*GFAP*), codificante per l'omonima proteina che forma il filamento intermedio specifico degli astrociti, sono la causa della malattia di Alexander, una rara leucodistrofia neurodegenerativa che si può presentare con due modalità di esordio: precoce (tipo I) e tardiva (tipo II), caratterizzate da segni clinici differenti e severità progressivamente decrescente. Sebbene non sia stata identificata ad oggi una correlazione tra il tipo di mutazione e l'età di esordio, è ormai noto che le mutazioni in *GFAP* causano una conformazione aberrante della proteina, che invece che costituire filamenti, è prona ad aggregare all'interno della cellula.

Le proteine cellulari sono soggette a turnover la cui velocità dipende dall'equilibrio che si instaura tra la loro produzione e lo smaltimento. E' stato dimostrato che le mutazioni in *GFAP* determinano l'accumulo della proteina nella cellula; questo effetto è dovuto a strutture intermedie di assemblaggio, gli oligomeri, che causano un ingolfamento del proteasoma, uno dei meccanismi cellulari deputati allo smaltimento delle proteine mal ripiegate. Questo produce due effetti: la prima è che l'accumulo di proteina mutata non smaltita causa la formazione di aggregati intracitoplasmatici, che assieme alle small heat shock proteins (sHSPs), molecole coinvolte nel ripiegamento corretto delle proteine (folding) e a subunità del proteasoma, formano le Fibre di Rosenthal (RFs); la seconda è che, per compensare la compromissione funzionale del proteasoma, la cellula attiva l'autofagia, un processo cellulare che, mediante la formazione di vacuoli auto digestivi, determina lo smaltimento di grosse proteine e di organelli non più funzionanti.

La conseguenza di tutto questo è che la diminuzione di proteina *GFAP* mutata, sia a livello di produzione (trascrizione del gene, stabilità del mRNA, produzione di proteina) sia di folding e/o smaltimento (eliminazione mediante proteasoma e autofagia) può essere considerata un meccanismo utile per diminuire l'effetto dannoso delle mutazioni di *GFAP*, avendo come risultato finale quello di contrastare l'accumulo e quindi l'aggregazione intracellulare della proteina mutata.

Inoltre, questi processi possono essere considerati potenziali bersagli farmacologici per la malattia di Alexander. In particolare, in un modello *in vitro*, noi abbiamo già riportato diversi risultati in questo ambito, qui di seguito riassunti:

1. l'aumento di espressione di α B-crystallin e HSP27, le due sHSPs che interagiscono con *GFAP*, è in grado di migliorare il ripiegamento delle proteine mutate p.R239C e p.R330G-E332K (Bachetti et al, 2008; Bachetti et al, 2010a);
2. l'antibiotico ceftriaxone e il composto naturale curcumina hanno dimostrato di essere in grado di migliorare la conformazione delle proteine p.R239C e p.R330G-E332K grazie ad una parziale eliminazione dovuta a induzione delle sHSPs e aumentata efficacia dell'autofagia; è stato inoltre osservato che entrambe le sostanze diminuiscono l'espressione del gene, in particolare a livello trascrizionale, mostrando quindi efficacia su due fronti (Bachetti et al, 2010a; Bachetti et al, 2012).

Razionale

Nonostante alcuni risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo*, ad oggi si sa ancora poco sulla patogenesi della malattia di Alexander. In particolare, gli studi *in vitro* hanno diverse limitazioni, prima tra tutte il fatto di dover usare contenitori cellulari che non sempre riproducono perfettamente la fisiologia dell'astrocita umano, seconda, quella di poter studiare l'effetto del farmaco solo sulla cellula e non sull'intero organismo.

A questo scopo, in collaborazione con la prof.ssa Simona Candiani del laboratorio di Neurobiologia dello Sviluppo dell'Università di Genova, da anni impiegata nello studio dell'embriologia in zebrafish, proponiamo un progetto mirato alla produzione di un modello di malattia di Alexander in questo sistema *in vivo*.

Zebrafish (specie *Danio Rerio*) è un modello animale di facile manipolazione che, essendo un vertebrato inferiore, è ben accettato dai comitati etici che si occupano dell'approvazione degli studi *in vivo*. Inoltre, rispetto ai modelli murini, il suo mantenimento è molto meno costoso e, grazie al suo ciclo vitale, permette di ottenere risultati in tempi molto inferiori. Grazie alla microiniezione nelle uova, è possibile far esprimere le proteine mutate di interesse negli embrioni di zebrafish e seguirne l'effetto sullo sviluppo in breve tempo. Questo permette di poter evidenziare eventuali dismorfologie o alterazioni molecolari che possono essere scelte come bersaglio di trattamenti farmacologici. Un'altra caratteristica di zebrafish è che la trasparenza dei suoi embrioni permette di evidenziare l'espressione di proteine utilizzando particolari tecniche quali l'uso di proteine fluorescenti coniugate alle proteine di interesse. Inoltre, in ultimo, grazie alla piccola dimensione e alla possibilità di analizzare le larve in piastre multiwells, è possibile effettuare degli screening di farmaci a larga scala che vengono poi selezionati in base alla loro capacità di recuperare il fenotipo corretto della larva.

Il rationale del lavoro qui presentato si basa sull'osservazione già riportata che il gene che codifica per la GFAP di zebrafish è caratterizzato da un'alta omologia con il gene umano, sia dal punto di vista dell'organizzazione introni-esoni, sia dal punto di vista della regolazione trascrizionale. Inoltre le due proteine GFAP mostrano un'identità del 67%, dove le regioni più conservate sono la struttura coiled-coil e il dominio tail in cui cadono i residui mutati nella malattia di Alexander. In particolare, i residui R79, R416, R88, che rappresentano una buona percentuale di mutazioni, sono molto conservati nelle due specie. Inoltre è stato dimostrato che anche in zebrafish la GFAP svolge il ruolo di filamento intermedio, rendendo così robusta l'idea di poter studiare l'effetto delle mutazioni di GFAP in questo modello animale (Nielsen, 2003).

Scopo del progetto

Per perseguire lo scopo del progetto, abbiamo pensato al coinvolgimento della prof.ssa Candiani in quanto, oltre alla sua esperienza in termini di manipolazione dei pesci, il suo percorso lavorativo è stato mirato allo studio dello sviluppo del sistema nervoso in Vertebrati inferiori (Garbarino et al, 2014; Bozzo et al, 2017), garantendo così un importante apporto non solo in termini pratici di esecuzione degli esperimenti ma anche di disegno sperimentale e interpretazione dei risultati.

In particolare, lo scopo del progetto sarà quello di esprimere, o in transiente o mediante la produzione di linee stabili, la proteina GFAP wild type e mutata, di seguirne il turnover e di identificare anomalie dello sviluppo sovrapponibili a quello che accade nell'uomo nella malattia di Alexander.

Il progetto sarà così articolato:

1. produzione di mRNA capped a partire dai costrutti GFAP-GFP nelle forme WT e mutata già in uso in laboratorio; questo permetterà di evidenziare la GFAP grazie alla fluorescenza emessa dalla green fluorescent protein (GFP) ad essa fusa.
2. microiniezione nelle uova di zebrafish
3. analisi dello sviluppo degli embrioni e marcatura con anticorpi specifici per sHSPs e proteasoma
4. effetto delle molecole già dimostrate efficaci *in vitro*

Rilevanza del progetto

In questo lavoro proponiamo di ottenere un modello che riproduca i tratti essenziali della malattia di Alexander; questo avrà il duplice scopo di ampliare le nostre conoscenze sui suoi meccanismi patogenetici e di avere la possibilità di studiare *in vivo* l'effetto di molecole mostrate avere un'efficacia *in vitro* oltre a cercarne di nuove mediante approcci di screening di farmaci a larga scala.

Inoltre, l'approccio in zebrafish è nuovo per la malattia di Alexander e permetterà di implementare le informazioni ottenute ad oggi dai modelli murini. Come descritto nel progetto, la sua versatilità, il basso costo di mantenimento e le tempistiche di sviluppo permettono, una volta messo a punto il modello, di procedere con diversi tipi di studi.

Referenze

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.

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

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

Bozzo M, Macrì S, Calzia D, Sgarra R, Manfioletti G, Ramoino P, Lacalli T, Vignali R, Pestarino M, Candiani S. The HMGA gene family in chordates: evolutionary perspectives from amphioxus.

Garbarino G, Costa S, Pestarino M, Candiani S. Differential expression of synapsin genes during early zebrafish development. *Neuroscience*. 2014 Nov 7;280:351-67

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

La *data ufficiale di inizio* del progetto prevediamo possa essere gennaio 2018.

Dall'autunno però inizieremo ad effettuare i primi esperimenti che ci permetteranno di capire se i plasmidi che abbiamo in uso vanno bene per effettuare gli esperimenti in zebrafish o se, in caso contrario, dobbiamo progettarne di nuovi. Questo allo scopo di poter partire a inizio anno nuovo con gli esperimenti in vivo avendo già messo a punto il sistema in vitro.

La *durata* del progetto stimata è 1 anno e mezzo, con termine 30 giugno 2019. I primi 3-6 mesi saranno dedicati alla preparazione del materiale necessario e agli esperimenti pilota per la messa a punto di concentrazioni/tempi di analisi.

I mesi successivi saranno dedicati all'espressione e al confronto tra le proteine mutate e GFAP wild type, allo studio degli effetti in termini di alterazioni macro- e microscopiche ed eventualmente allo studio dell'effetto di molecole efficaci *in vitro*.

Personale coinvolto nel progetto

Le unità in termini di laboratori coinvolti saranno due, la nostra (UOC Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini) e quella della prof.ssa Candiani (Laboratorio di Neurobiologia dello Sviluppo, Università di Genova).

Il personale che verte su questo progetto consisterà sicuramente di tre persone: la sottoscritta, la prof.ssa Candiani e il dott. Bozzo (che inizierà il 1 novembre il dottorato di ricerca nel suo laboratorio), che lavoreranno tutti part-time sul progetto in quanto pagati su altri fondi di ricerca. Ciò non significa che il progetto subirà rallentamenti: il nostro lavoro prevede tempistiche sperimentali che possono perfettamente essere conciliate con altri progetti, senza che nessuno di questi ne risenta temporalmente.

Budget

Voci di spesa	euro
Kit per microiniezione e costrutti GFAP	3000
Mantenimento animali e attrezzature	4000
Materiale per microiniezione	2000
plasticheria	2000
Materiale per immunostochimica	2000
Farmaci	1000
Reagenti vari	2400
Spese di pubblicazione	1000
Partecipazione a congressi	1000
Overheads (8%) per Istituto Gaslini	1600
TOT	20000