

Proposta di progetto di ricerca annuale (1 Maggio 2018 – 30 Aprile 2019) dal titolo

“Sintesi proteica e metabolismo della proteina Amyloid Precursor Protein (APP) in fibroblasti di individui con Sindrome dell’X Fragile: biomarcatori e quadro clinico.”

Stato dell’arte

La de-regolazione delle vie che controllano la sintesi delle proteine è uno dei fenotipi chiave della Sindrome X Fragile (FXS). Studi effettuati sul modello murino per lo studio della sindrome (topi Fmr1 KO) suggeriscono che l'eccesso di sintesi proteica contribuisce alla maggioranza dei difetti neurologici correlati alla malattia (Bagni et al., 2012). Per questo motivo la regolazione della sintesi proteica è stata oggetto di numerosi trials clinici, che ad oggi non si sono dimostrati efficaci (Berry-Kravis et al., 2017).

Recentemente, nel nostro laboratorio, abbiamo condotto uno studio volto a valutare i livelli di sintesi proteica in cellule derivanti da individui con la Sindrome dell’X Fragile e abbiamo osservato che solo un sottogruppo di pazienti mostra livelli molto alti di sintesi proteica – rispetto alla media di individui non affetti (Jacquemont, Pacini et al., 2018). Questi risultati offrono una possibile spiegazione al mancato successo dei trials clinici finora conclusi.

In un nostro lavoro recente (Pasciuto et al., 2015), abbiamo dimostrato il ruolo di FMRP nella regolazione dell’espressione di APP e dell’enzima ADAM10 che taglia la proteina APP rilasciando una piccola porzione solubile chiamata sAPP α . Questo studio, condotto sul modello murino della sindrome, dimostra che l’eccessivo rilascio del sAPP α è alla base dei difetti molecolari, tra i quali l’aumento della sintesi proteica, e comportamentali osservati in questi topi modello per la FXS. Il trattamento con un peptide (TAT-Pro ADAM10⁷⁰⁹⁻⁷²⁹) in grado di ridurre l’attività di ADAM10 e ridurre la produzione di sAPP α porta ad un miglioramento di queste caratteristiche in una ristretta finestra temporale corrispondente alla fase di sviluppo e consolidamento dei contatti sinaptici (Pasciuto et al., 2015).

Obiettivo dello studio e piano sperimentale

I nostri studi condotti su cellule (fibroblasti) di individui con FXS indicano che: 1) soltanto un sottogruppo di pazienti mostra un’aumentata sintesi proteica; 2) i fibroblasti costituiscono un robusto modello sperimentale che ricapitola alcuni dei fenotipi molecolari osservati nei neuroni del modello murino per la FXS (Jacquemont, Pacini et al., 2018).

Dati preliminari mostrano che la disregolazione di sAPPa avviene soltanto nei fibroblasti dei topi giovani, una età correlabile ai 12-14 anni nell'uomo ad indicare la presenza di una finestra temporale in cui si potrebbe in un futuro intervenire.

In questo progetto proponiamo di verificare l'alterazione del metabolismo di APP in fibroblasti derivanti da individui con Sindrome dell'X Fragile di chiarire la correlazione tra i livelli di sintesi proteica e il quadro clinico.

In particolare ci proponiamo di estendere lo studio ad un numero significativo di pazienti. Le linee cellulari umane che mostrano maggiore disregolazione della sintesi proteica e produzione di sAPP α verranno selezionate per testare l'efficacia del peptide TAT-Pro ADAM10⁷⁰⁹⁻⁷²⁹ nell'uomo.

Le linee di fibroblasti umani derivati da pazienti FXS ci verranno forniti dai nostri collaboratori Prof. Giovanni Neri e Dr. Elisabetta Tabolacci (Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma); Dr. Sebastien Jacquemont (Università di Montreal, Canada); Dr. Randi Hagerman and Dr. Flora Tassone (MIND Institute, Davis, USA); Prof. Frank Kooy (Università di Anversa, Belgio); Prof. Rob Willemsen (Erasmus Medical Center, Rotterdam, Olanda). Fibroblasti di individui sani (n= 20) acquistati da Coriell Institute for Medical Research e di individui FXS (n = 20) sono già disponibili nel nostro laboratorio di Tor Vergata. Proponiamo di acquistare altre linee cellulari di individui controllo dall'ATCC (n = 10) per arrivare ed essere nelle condizioni di avere ben rappresentate due diverse età – inclusa quella dello sviluppo.

Le linee di fibroblasti controllo ed FXS saranno espanse e caratterizzate come segue:

- 1) I livelli di sintesi proteica saranno misurati in campioni di controllo ed FXS, utilizzando un metodo non radioattivo (SUnSET) (Schmidt et al., 2009), con un protocollo funzionante nel nostro laboratorio. Per misurare le proteine neo-sintetizzate, i fibroblasti saranno incubati con puromicina. Le proteine marcate saranno successivamente rilevate mediante western blotting utilizzando un anticorpo monoclonale anti-puromicina.
- 2) I livelli delle proteine FMRP, APP e ADAM10 saranno misurati nei campioni derivanti da controlli e FXS mediante western blotting utilizzando anticorpi specifici.
- 3) I livelli del sAPP α rilasciato nel terreno di coltura delle cellule verranno misurati tramite l'utilizzo di specifici saggi ELISA.
- 4) Molti pazienti FXS sono mosaici e possono quindi esprimere livelli variabili di RNA messaggero e proteina (Pretto et al., 2014). I livelli di RNA messaggero relativo all'espressione del gene *FMR1* verranno analizzati mediante PCR quantitativa.

5) Le linee cellulari selezionate (disregolazione delle proteine APP-ADAM10) verranno trattate con il peptide per inibire attività eccessiva di ADAM10. L'efficacia del trattamento sarà valutata misurando i livelli di sAPP α e i livelli di sintesi proteica.

6) I livelli di sintesi proteica e l'alterazione del metabolismo di APP saranno correlati con l'età degli individui FXS e con la severità dei sintomi clinici. Le analisi di correlazione verranno effettuate utilizzando programmi per l'analisi statistica.

L'obiettivo di questo progetto è quello di analizzare un totale di $n = 30$ nuove linee di fibroblasti derivanti da individui con FXS ($n = 20$) e controlli ($n=10$) di diversa età e con diverso fenotipo clinico. Risultati attesi: 1) verificare che il livello di sintesi proteica possa essere utilizzato come biomarcatore per determinare la severità del quadro clinico del paziente e successivamente disegnare una terapia personalizzata; 2) Identificare una finestra temporale postnatale nell'uomo – utilizzando cellule in coltura umane- in cui è presente un eccesso di sAPP α e verificare in cellule umane l'efficacia terapeutica del peptide.

Tempi di realizzazione

Lo studio descritto sarà sviluppato entro 1 anno dalla data di inizio progetto. Tutti gli esperimenti verranno eseguiti presso il laboratorio della Prof. Bagni, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata', Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Via Montpellier, 1 00133 Roma.

Personale coinvolto nel progetto.

Prof. Claudia Bagni. Ruolo: supervisione del progetto.

Giorgia Pedini. Studentessa di dottorato (3 anno). Ruolo: disegno sperimentale, espansione e caratterizzazione dei fibroblasti, estrazione delle proteine e dell'RNA, saggio SUnSET e trattamento con peptide. Richiesto lo stipendio per un anno 15.000 euro.

Giulia Cencelli. Studentessa di dottorato (2 anno). Ruolo. Fornirà un aiuto nella espansione delle cellule umane. Non è richiesto lo stipendio.

Il costo per il materiale consumabile per questo progetto – circa 7000 euro- verrà coperto con altri fondi di ricerca.

Bibliografia

Bagni, C., Tassone, F., Neri, G., and Hagerman, R. (2012). Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J. Clin. Invest.* 122, 4314–4322.

Berry-Kravis E.M., Lindemann L., Jønch A.E., Apostol G., Bear M.F., Carpenter R.L., Crawley J.N., Curie A., Des Portes V., Hossain F., Gasparini F., Gomez-Mancilla B., Hessler D., Loth E., Scharf S.H., Wang P.P., Von Raison F., Hagerman R., Sporeen W., Jacquemont S. (2017). Drug development for neurodevelopmental disorders: lessons learned from fragile X syndrome. *Nat. Rev. Drug Discov.* doi:10.1038/nrd.2017.221
Published online 8 Dec 2017

Jacquemont S., Pacini L., Jønch AE, Cencelli G., Rozenberg I., He Y., D'Andrea L., Pedini G., Eldeeb M., Willemsen R., Gasparini F., Tassone F., Hagerman R., Gomez-Mancilla4 B. and Bagni C. (2018). Protein synthesis levels are increased in a subset of individuals with Fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, in press.

Pasciuto E., Ahmed T., Wahle T., Gardoni F., D'Andrea L., Pacini L., Jacquemont S., Tassone F., Balschun D., Dotti C.G., Callaerts-Vegh Z., D'Hooge R., Müller U.C., Di Luca M., De Strooper B., Bagni C. (2015). Dysregulated ADAM10-mediated processing of APP during a critical time window leads to synaptic deficits in fragile X syndrome. *Neuron* 87, 382–398.

Pretto D., Yrigollen C.M., Tang H.T., Williamson J., Espinal G., Iwahashi C.K., Durbin-Johnson B., Hagerman R.J., Hagerman P.J., Tassone F. (2014). Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1 full mutations. *Front Genet.* 5, 318.

Schmidt, E.K., Clavarino, G., Ceppi, M., and Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods* 6, 275–277.