

2 Settembre, 2011  
Istituto di Genetica e Biofisica “A- Buzzati Traverso”  
Via Pietro Castellino 111  
80131, Napoli

Oggetto: Relazione Scientifica STM

### **Patofisiologia molecolare di disordini associati al trasporto lisosomiale, nel sistema nervoso centrale**

Le lipofuscinosi Neuronal Ceroidea rappresentano un gruppo di disordini di natura ereditaria che fanno parte dell'ampia classe dei disordini da accumulo lisosomiale. La caratteristica fenotipica principale è l'accumulo di materiale autofluorescente, di tipo lipofusina, all'interno dei compartimenti acidi.

Fino ad oggi sono state identificate 22 mutazioni nel gene *CLN7*. Nessuna di queste mutazioni modifica la localizzazione della proteina lasciando pensare ad una alterazione della sua attività

Il lavoro svolto durante il soggiorno presso i laboratori del Prof. Bruno Gasnier si è focalizzato su due aspetti:

- a) Allo scopo di ottenere un modello cellulare due linee di fibroblasti ottenuti da pazienti recanti la mutazione G208R responsabile di una severa forma della patologia sono state analizzate per la presenza di compartimenti acidi contenenti materiale autofluorescente. Allo scopo di promuovere l'attività lisosomiale e di conseguenza l'accumulo di materiale nei lisosomi di pazienti G208R le cellule sono state trattate con Rapamicina (un antibiotico in grado di stimolare mediante autofagia la degradazione lisosomiale) e successivamente analizzate. Sono state analizzati i lisosomi sia per la loro dimensione (ci aspettavamo un aumento della dimensione determinato da un accumulo di materiale) che per la loro autofluorescenza. Tale analisi è stata effettuata mediante l'utilizzo di un apposito software in grado di misurare automaticamente parametri di taglia e dimensione. Pur avendo osservato una tendenza ad un maggior dimensione nei lisosomi di pazienti G208R tale differenza non risultava essere statisticamente significativa. Una possibile spiegazione potrebbe essere dovuta al fatto che il fenotipo cellulare “malato” possa essere identificato esclusivamente in una popolazione di neuroni piuttosto che in colture di fibroblasti. Ciò sarebbe in accordo con l'osservazione che nei pazienti il danno è principalmente a carico dei neuroni mentre nei distretti periferici non sono stati osservati fenotipi specifici. Tale osservazione ci ha spinto a iniziare un processo di differenziazione dei fibroblasti in neuroni mediante la tecnica della generazione di inducibile Pluripotent Stem Cells (iPS) come descritto nel punto b)
- b) A tale scopo abbiamo deciso di applicare la tecnica dell'iPS per poter indurre tali fibroblasti a differenziare in neuroni come descritto nella pubblicazione: *Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors (2006). Cell 126, 663–676.* I fibroblasti sono stati infettati con i retrovirus in

grado di esprimere i fattori differenzitivi Oct3/4, c-Myc, Sox2, e Klf4, precedentemente generati nel laboratorio ospitante. I cloni in grado di “retrocedere” ad uno stadio di pluripotenza sono attualmente in fase di caratterizzazione. Il passaggio successivo, che verrà sviluppato parallelamente a Napoli e Parigi, richiederà la differenziazione di tali cellule pluripotenti in neuroni. Una volta ottenuti dei neuroni maturi ripeteremo l’analisi morfologia sulla taglia dei lisosomi e sulla presenza di materiale autofluorescente. Questo approccio permetterà in futuro di generare dei modelli cellulari per le diverse mutazioni identificate in grado di causare forme con severità progressiva della patologia. Avremo quindi a disposizione un modello cellulare in grado di riprodurre con severità diversa in cellule il fenotipo osservato nei pazienti

Tali approcci verranno sviluppati nel prossimo futuro in collaborazione con il Prof. Bruno Gasnier. In effetti sono previsti soggiorni reciproci a Napoli e Parigi nell’ambito di un progetto FIRB Internazionale

In fede  
Gian Carlo Bellenchi



2 Settembre, 2011

Istituto di Genetica e Biofisica "A- Buzzati Traverso"

Via Pietro Castellino 111

80131, Napoli

Oggetto: Anticipo rientro STM - Bellenchi

Il sottoscritto Gian Carlo Bellenchi fruitore della Short Term Fellowship del CNR (periodo programmato 24 Giugno, 15 Luglio) dichiara che in seguito ad urgenti ed improvvisi motivi familiari si è visto obbligato ad anticipare la data del rietro in Italia, originariamente programmata per il 15 di Luglio 2011 al 10 dello stesso mese.

In fede

Gian Carlo Bellenchi

