

Titolo divulgativo: “Le cellule staminali pluripotenti indotte come modello di studio dei meccanismi alla base di malattie metaboliche ereditarie”

Titolo scientifico: “Analisi delle alterazioni di pathway nella malattia di Gaucher in macrofagi e neuroni dopaminergici derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)”

Responsabile: Andrea Pession (Pediatric Unit, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna)

Gruppo di Studio: Daria Messelodi¹, Annalisa Astolfi², Salvatore Nicola Bertuccio¹, Silvia Strocchi³

¹ Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna

² Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale

³ Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna

Relazione scientifica dell'attività svolta

Introduzione e scopo dello studio

La malattia di Gaucher (GD) è una malattia genetica con ereditarietà autosomica recessiva, causata da alterazioni nel gene *GBA1* che codifica per l'enzima lisosomiale β -glucocerebrosidasi. Nonostante sia considerata una malattia monogenica, è caratterizzata da un ampio spettro di manifestazioni fenotipiche con pazienti che presentano una sintomatologia sistemica con moderato coinvolgimento viscerale e altri affetti da forme neurologiche gravi. Per consentire un intervento terapeutico mirato, è quindi di fondamentale importanza identificare le vie di segnalazione cellulare potenzialmente coinvolte nella modulazione del fenotipo e del decorso della malattia.

L'obiettivo principale del progetto è stato dunque quello di studiare i meccanismi alla base dell'insorgenza delle diverse forme di malattia di Gaucher utilizzando iPSC derivate da pazienti e donatori sani.

Le iPSC sono state differenziate verso il destino di monociti/macrofagi, per studiare nel comparto ematologico i meccanismi che innescano la risposta infiammatoria, e in neuroni dopaminergici per valutare le vie di segnalazione legate alla neurodegenerazione e alla neuroinfiammazione attivate dalla alterata funzionalità dell'enzima GCase e dall'accumulo di substrati. L'identificazione dei bersagli molecolari coinvolti nell'infiammazione e nella morte cellulare neuronale che sta alla base delle manifestazioni più gravi della malattia è strumentale all'individuazione di nuovi target terapeutici.

Disegno sperimentale

Nel periodo antecedente all'erogazione del finanziamento, sono state generate e caratterizzate linee di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Sono state utilizzate una linea da donatore sano e due linee di pazienti affetti da GD tipo 1 (mutazioni in *GBA1* N370S/L444P e N370S/N370S) riprogrammate nel nostro laboratorio insieme ad una linea già riprogrammata e corretta geneticamente nel laboratorio del Prof Deleidi dell'università di Tubinga (mutazione in *GBA1* L444P/L444P). Per includere un'ulteriore condizione di confronto, la linea iPSC da donatore sano è stata trattata con l'inibitore irreversibile della GCase, CBE.

Le iPSC sono state differenziate verso il destino monocito/macrofago utilizzando un sistema di co-cultura 2D su matrice adattata da Chou et al. [1] e stimolate con un cocktail di citochine specifico per ogni punto temporale del differenziamento. Il differenziamento ematopoietico delle iPSC è stato valutato al 13°, 15° e 18° giorno del protocollo attraverso analisi di citofluorimetria, verificando prima la positività per i marcatori di precursori ematopoietici (CD34, CD43, CD45) e successivamente per marcatori più tardivi del lineage monocitario/macrofagico (CD11b, CD14 e CD163).

Le cellule sono state poi differenziate verso il destino di precursori neurali (NPC) e di neuroni dopaminergici maturi per mezzo di protocolli stabiliti [2] e caratterizzate tramite immunofluorescenza per i marcatori neuronali e dopaminergici (β 3tubulina e TH).

Risultati ottenuti

I monociti-macrofagi derivati da GD-iPSC mostrano un difetto di crescita e l'attivazione del pathway della necroptosi

Le iPSC GD-1 insieme alla linea CTRL sono state amplificate e successivamente differenziate in precursori ematopoietici e in monociti/macrofagi. Dal 10° giorno del protocollo di differenziamento le cellule CTRL sono state trattate con CBE 250 μ M per ottenere un ulteriore modello di confronto. Al 12° giorno di differenziamento è stato raccolto il terreno contenente i precursori ematopoietici in sospensione e sono stati testati gli specifici marcatori di *lineage*. Entrambe le linee CTRL, CTRL+CBE e GD-1 sono in grado di dare origine a cellule progenitrici ematopoietiche CD34+, CD33+ e CD45+ (Figura 1A). L'immunofenotipo è stato poi valutato al 19° giorno di differenziamento quando le cellule sono risultate positive per i marcatori maturi CD11b, CD14 e CD163. È interessante notare che la linea GD-1 esprime livelli significativamente più alti di tutti i marcatori analizzati rispetto alla linea CTRL. Anche le cellule trattate con CBE mostrano la stessa tendenza, suggerendo che le cellule GD possano avere una maggiore efficienza di differenziamento (Figura 1B).

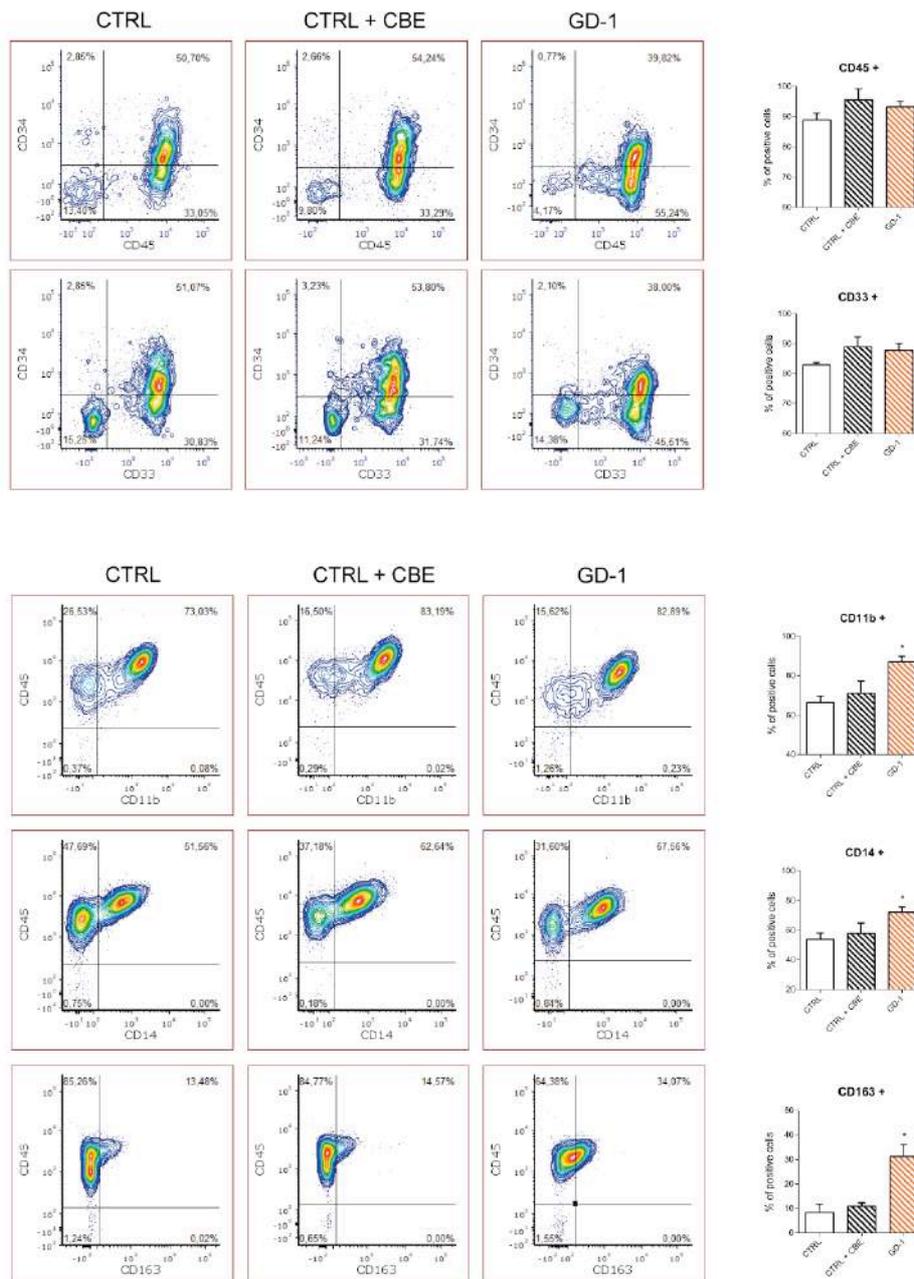


Figura 1

Al giorno 15 del protocollo di differenziamento le cellule CD43+ sono state raccolte e seminate sia in condizioni di coltura semisolida che liquida arricchite con specifiche citochine ematopoietiche per verificare le loro proprietà di autorinnovamento e il tasso proliferativo. Le cellule CTRL trattate con CBE e GD-1 hanno mostrato una minore capacità di dare origine a colonie in metilcellulosa, condizione che è diventata più evidente dopo il primo e il secondo passaggio (Figura 2A). Una situazione simile si evidenzia anche nell'analisi della coltura liquida (Figura 2B). Il difetto di crescita delle linee GD rispetto al CTRL è statisticamente significativo e sembra essere strettamente

correlato al difetto enzimatico dal momento che il trattamento con CBE ha causato un *deficit* simile a quello delle cellule derivate da paziente.

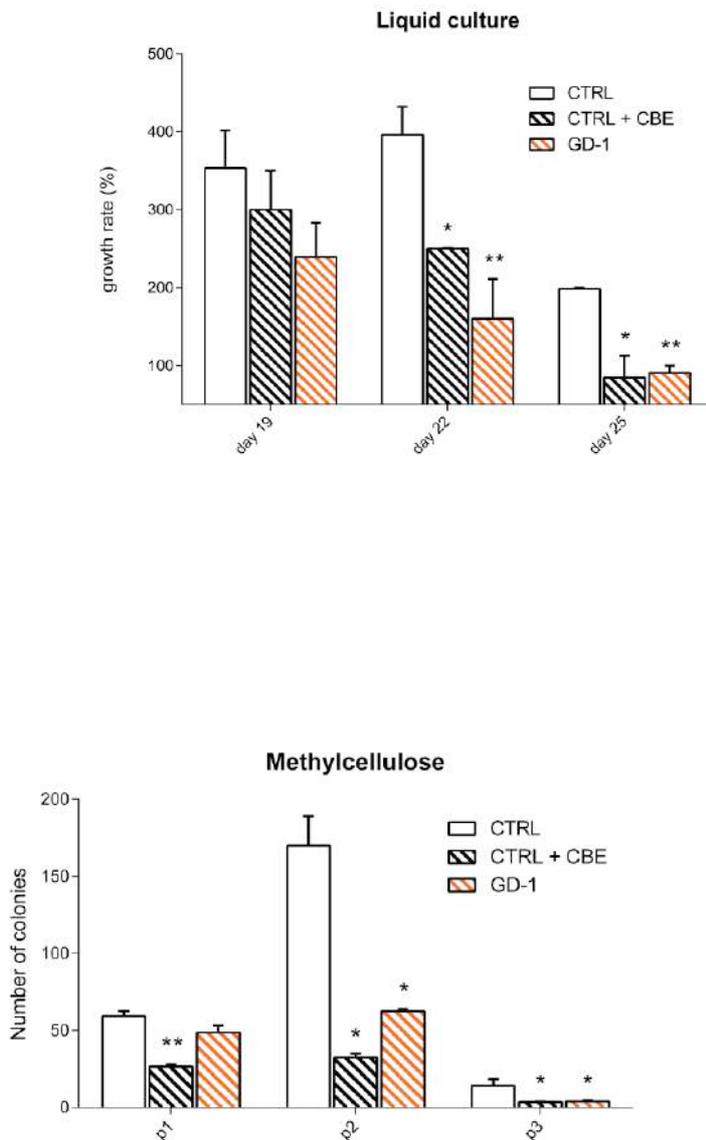


Figura 2

Una riduzione del tasso di crescita può essere spiegata sia con una diminuzione della proliferazione che con un aumento dell'induzione della morte cellulare. Poiché l'innescò di meccanismi infiammatori e il rilascio di citochine sono caratteristiche comuni della fisiopatologia della GD, abbiamo ipotizzato che un meccanismo di morte cellulare attivato dall'infiammazione possa essere un'interessante via di segnalazione coinvolta. L'attenzione si è concentrata sull'analisi della via della necroptosi che era già stata segnalata come potenzialmente deregolata in un modello murino di GD. La necroptosi è un processo di necrosi programmata, rappresenta una risposta cellulare allo stress ambientale che può essere indotto da infiammazione, lesioni chimiche e meccaniche o infezioni. I mediatori essenziali di questa via sono tre protein chinasi interagenti con i recettori (RIPK): RIPK1,

RIPK3 e MLKL, mentre il segnale di attivazione è probabilmente mediato dal sistema del recettore TNF.

Per testare l'attivazione della necroptosi nel nostro modello GD, è stato estratto l'RNA dalle cellule sia a livello di iPSC che dopo 15 e 19 giorni di differenziamento e sono stati analizzati i livelli di espressione dei tre principali effettori del pathway. I livelli di espressione di RIPK3 e MLKL sono risultati entrambi fortemente aumentati nella linea GD-1 rispetto al CTRL, suggerendo che la necroptosi è altamente attivata quando l'enzima GCase non è strutturalmente e funzionalmente presente nella cellula (Figura 3).

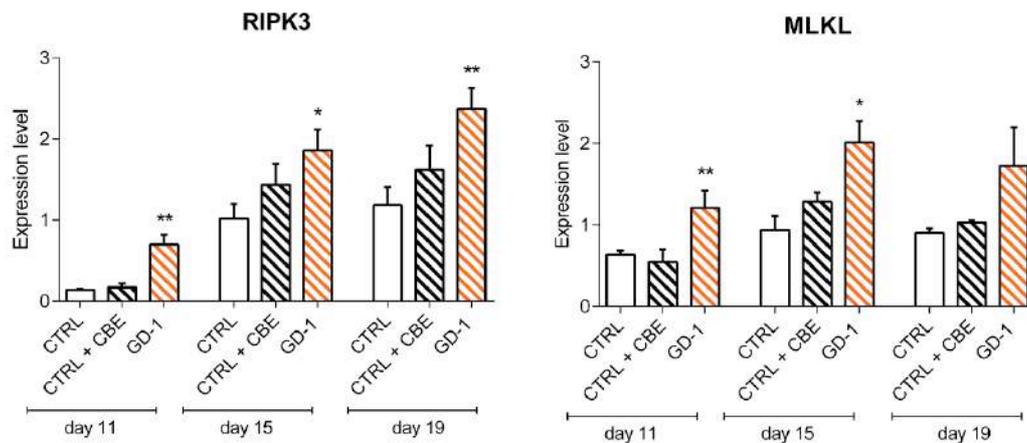


Figura 3

Il pathway di Hippo è iperattivato in neuroni derivati da GD-iPSC

Per indagare il fenotipo neuronopatico, una terza linea GD (GD-3) e il rispettivo controllo isogenico è stata utilizzata, in quanto presentante un genotipo associato a manifestazione neuronopatiche.

Le iPSC derivate da donatore sano (CNTR) e le linee GD-3 e GD-3 GC sono state differenziate verso lo stadio di NPC. Considerando i dati relativi al difetto di crescita precedentemente ottenuti sulle cellule monocitiche/macrofagiche, è stato analizzato il potenziale di crescita delle NPC. Tutte le linee hanno mostrato una forte riduzione del tasso di crescita nella condizione patologica, confermando l'ipotesi che il *deficit* enzimatico induca una diminuzione della proliferazione cellulare e/o un aumento della morte cellulare. La marcatura con ioduro di propidio e annessina V dopo due giorni di condizioni di coltura confluyente, conferma il fatto che le linee GD mostrano una maggiore percentuale di cellule apoptotiche rispetto alla controparte sana e un maggior tasso complessivo di morte (Figura 4A-B).

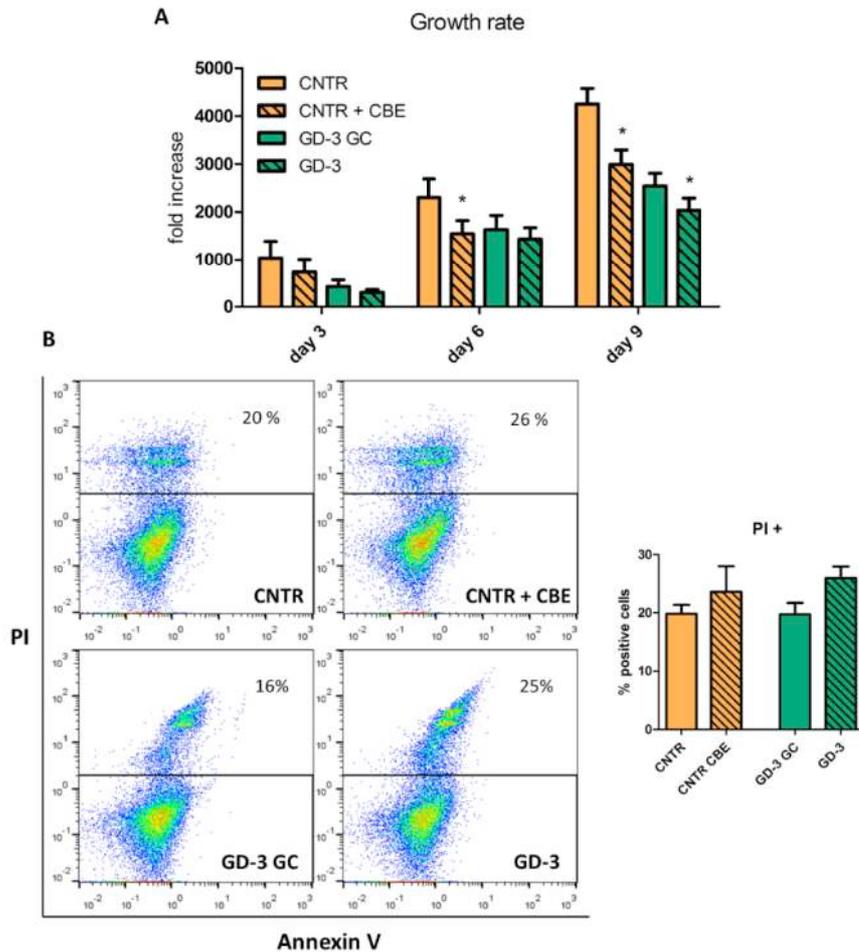


Figura 4

Poiché i principali effettori della via della necroptosi non sono risultati altamente espressi nelle linee analizzate allo stadio neuronale, abbiamo deciso di concentrare la nostra attenzione su un'altra via potenzialmente interessante che era già stata riportata come deregolata in un modello di *Drosophila*-GD dal nostro gruppo. La via di Hippo è un meccanismo molecolare strutturalmente e funzionalmente conservato coinvolto nel controllo di molte funzioni cellulari, tra cui lo sviluppo, l'omeostasi dei tessuti, l'immunità, la proliferazione, la tumorigenesi, l'apoptosi e la morte cellulare. Hippo è molto noto per il suo ruolo di oncosoppressore ma, un numero considerevole di pubblicazioni recenti, ha messo in luce un suo ruolo in processi neurodegenerativi. Considerando che l'iperattivazione del *core* chinasi di Hippo porta alla *down*-regolazione di geni legati alla proliferazione e antiapoptotici, la sua modulazione può giocare un ruolo cruciale anche nella condizione di GD neuronopatica.

L'analisi dei livelli di espressione dei target a valle della via di Hippo, ANKHD1, CTGF e CYR61, sono stati analizzati tramite Real Time PCR nei tre modelli di confronto sia a livello di NPC che di neuroni (Figura 5). Tutti i target sono apparsi *down*-regolati nella linea GD rispetto alla controparte

corretta geneticamente o a quella sana a livello neuronale, suggerendo un'iperattivazione del *core* della via di Hippo nella fase di differenziamento terminale neuronale. Certamente, la coppia di linee GD-3 e GD-3 GC è un modello più affidabile per studiare le alterazioni del *pathway* in condizioni isogeniche, mentre il trattamento CBE rappresenta solo un'approssimazione della situazione fisiologica. Il CBE causa infatti solo un *deficit* funzionale dell'enzima GCase ma non è in grado di riprodurre il complesso ambiente cellulare dovuto alle mutazioni in *GBA1*.

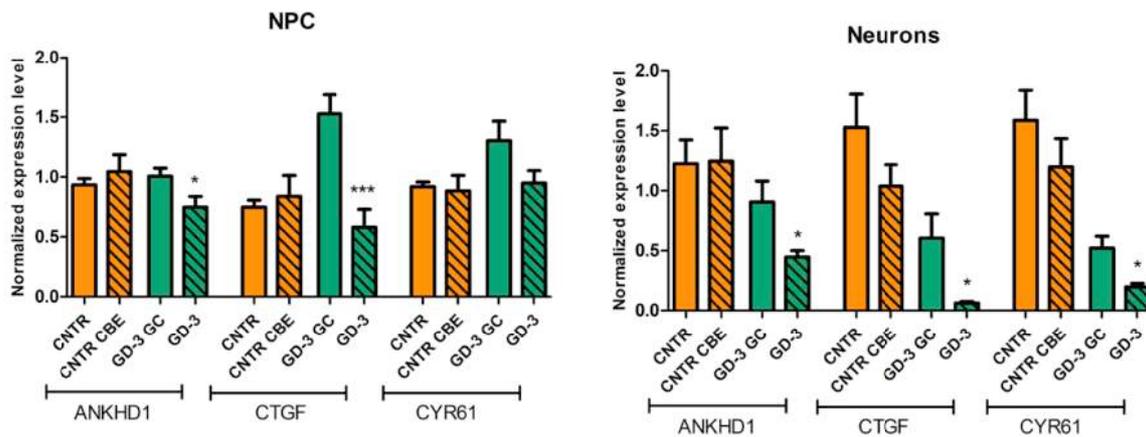


Figura 5

Per meglio indagare questo potenziale meccanismo, i livelli proteici di YAP, il principale effettore di Hippo, e la sua forma fosforilata (pYAP) sono stati valutati tramite immunofluorescenza. YAP è un fattore trascrizionale in grado di raggiungere il nucleo nella forma defosforilata dove induce la trascrizione di un ampio numero di fattori a valle. Quando la via di Hippo è attiva, YAP è fosforilato e trattenuto nel citoplasma. L'analisi in immunofluorescenza della localizzazione subcellulare di YAP ha rivelato una significativa diminuzione dei livelli di localizzazione nucleare della proteina nei precursori neurali GD-3 e nei neuroni mDA (Figura 6). Anche le cellule trattate con CBE mostrano una piccola riduzione della localizzazione nucleare dell'effettore principale di Hippo, suggerendo che una *iper-Hippo condition* possa di fatto verificarsi in neuroni dopaminergici derivati da iPSC di pazienti GD.

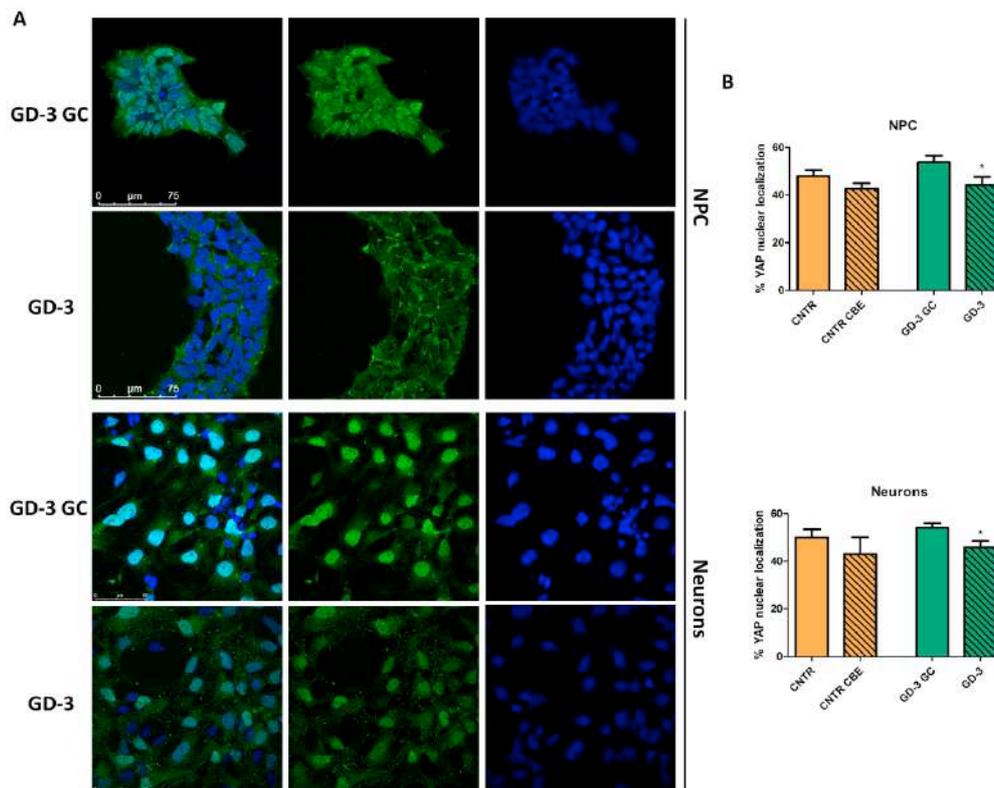


Figura 6

Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano come le iPSC siano un valido modello di studio per la malattia di Gaucher in quanto sono in grado di differenziare in maniera efficace verso il *lineage* monocito/macrofagico e neuronale, che costituiscono i sottotipi cellulari maggiormente coinvolti nell'accumulo di substrati glicosfingolipidici caratteristico della patologia. Le cellule derivate da iPSC con *deficit* di GBA1 presentano un difetto di crescita rispetto alla linea sana dopo differenziamento verso entrambi i *lineage*, accompagnato da un aumento del tasso di morte cellulare. L'identificazione di vie di segnalazione trascrizionalmente alterate, come la necroptosi e Hippo, che possono contribuire allo squilibrio del metabolismo cellulare, costituisce un primo passo verso lo sviluppo di nuovi approcci farmacologici alla GD che sono necessari soprattutto per i pazienti affetti dalle forme neuronopatiche.

Bibliografia

1. S. Chou, M. Byrska-Bishop, J. Tober, Y. Yao, D. Vandorn, J. Opalinska, and et al, "Trisomy

21-associated defects in human primitive hematopoiesis revealed through induced pluripotent stem cells,” *Proc Natl Acad Sci*, vol. 109, pp. 17573–17578, 2012.

2. Reinhardt P, Glatza M, Hemmer K, Tsytsyura Y et al. Derivation and Expansion Using Only Small Molecules of Human Neural Progenitors for Neurodegenerative Disease Modeling. *PLOS ONE* 2013 8(11).