

## LA MALATTIA DI FABRY: CORREZIONE IN VITRO DI ERRORI DI SPLICING E DI MUTAZIONI CONFORMAZIONALI

L. Ferri<sup>1,2</sup>, A. Caciotti<sup>2</sup>, G. Covello<sup>3</sup>, D. Perrone<sup>4</sup>, K.J. Valenzano<sup>5</sup>, R. Mignani<sup>6</sup>, F. Cecchi<sup>7</sup>, B. Tomberli<sup>7</sup>, W. Borsini<sup>8</sup>, R. Parrini<sup>9</sup>, C. Feliciani<sup>10</sup>, D. Antuzzi<sup>10</sup>, A. Fiumara<sup>11</sup>, M.A. Donati<sup>12</sup>, R. Guerrini<sup>1,2</sup>, M. A. Denti<sup>3</sup>, A. Morrone<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Università degli Studi di Firenze, Firenze; <sup>2</sup>Laboratorio Diagnostica delle Malattie del Sistema Nervoso e del Metabolismo, Clinica di Neurologia Pediatrica, A.O.U. "A. Meyer", Firenze; <sup>3</sup>Centre for Integrative Biology (CIBIO), Università di Trento, Trento; <sup>4</sup>Dipartimento di Biologia e Evoluzione, Università di Ferrara, Ferrara; <sup>5</sup>Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ 08512, USA; <sup>6</sup>Unità Operativa di Nefrologia, Ospedale Infermi, Rimini; <sup>7</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Firenze, Firenze; <sup>8</sup>Unità Operativa di Nefrologia, AOU Careggi, Firenze; <sup>9</sup>Unità Operativa Metabolica, Ospedale San Gerardo, Monza; <sup>10</sup>Università Cattolica di Roma, Ospedale "Gemelli", Roma; <sup>11</sup>Dipartimento di Pediatria, Università di Catania, Catania; <sup>12</sup>Sezione di Malattie Metaboliche e Muscolari, A.O.U. "A. Meyer", Firenze.

**Background:** La malattia di Fabry (FD) è un errore congenito del metabolismo causato dal deficit totale o parziale dell'enzima lisosomiale alfa-galattosidasi A ( $\alpha$ -GAL A). L'enzima è codificato dal gene *GLA*, localizzato sul cromosoma X. L'unico trattamento specifico attualmente disponibile per la FD è la Terapia Enzimatica Sostitutiva (ERT), che richiede infusioni periodiche ed è molto costosa. Sono stati pertanto proposti approcci terapeutici alternativi, come la terapia con chaperoni farmacologici (PCT), che è mirata alla correzione della proteina endogena mutata. Nella FD è stata infatti ampiamente dimostrata l'efficacia dell'1-deossigalattosidasi (DGJ) come chaperone specifico per il sito attivo (ASSC) che può ripristinare l'attività enzimatica in molte mutazioni conformazionali dell' $\alpha$ -GAL A.

Il gene *GLA* in condizioni fisiologiche produce due trascritti, uno più rappresentato che codifica l'enzima  $\alpha$ -GAL A e uno minoritario con funzione sconosciuta che include una regione intronica e porta ad un codone di stop prematuro. Uno sbilanciamento nell'espressione di questi due trascritti si associa ad FD ed può essere causato dalle mutazioni introniche profonde g.9273C>T or g.9331G>A. La mutazione g.9331G>A ha inoltre un'incidenza particolarmente alta nella popolazione asiatica.

Per questo tipo di mutazioni un approccio terapeutico potrebbe essere rappresentato dall'Exon Skipping (ES), mediante l'uso di oligonucleotidi antisense (AON) o U1snRNAs antisense (U1asRNA).

**Scopo:** Il nostro studio è focalizzato sulla messa a punto di molecole antisense specifiche per promuovere l'ES nelle mutazioni introniche profonde associate alla malattia di Fabry e sulla determinazione della responsività al DGJ di mutazioni missenso nuove del gene *GLA*.

**Risultati:** Abbiamo costruito un minigene per l'overespressione della mutazione g.9273C>T e un set di AON e di U1asRNA diretti su tale mutazione per silenziarla. Le molecole antisense sono state saggiate sul minigene e sulla linea cellulare di un paziente affetto da FD che esprimono la mutazione g.9273C>T.

I risultati preliminari mostrano che una delle molecole di U1asRNA disegnate ha un buon effetto nel promuovere il rescue dell'attività enzimatica nel minigene e una certa efficacia anche sulla linea cellulare del paziente.

Per quanto riguarda il test del DGJ abbiamo raccolto e testato varie linee cellulari di pazienti Fabry. Due nuove mutazioni missenso sono state identificate che hanno un'alta responsività al DGJ.

**Conclusioni:** Il nostro studio suggerisce la possibilità di mettere a punto una nuova strategia terapeutica basata sull'ES per le mutazioni introniche profonde nella FD. Inoltre il nostro studio indica alcune nuove mutazioni dell' $\alpha$ -GAL A potenzialmente trattabili con la PCT.

### Ringraziamenti:

- Un particolare riconoscimento va alla Fondazione Meyer ONLUS-Firenze per il suo supporto finanziario a Lorenzo Ferri (Meyer Children's Hospital's Young Researcher grant "Terapia per la correzione degli splicing dovuti a difetti dell'RNA nella malattia di Fabry e studi genetico-molecolari per la caratterizzazione del prodotto proteico alternativo del gene *GLA*").

- La nostra gratitudine va alla Fondazione Meyer ONLUS-Firenze e alla Regione Toscana per il loro supporto finanziario (progetto "POR CRO FSE 2007-2013, MEYER AON-CHAP").

- Questo lavoro è stato parzialmente sostenuto da finanziamenti Genzyme Corporation and Shire Italia.