

Progetto “ISDIS – Innovazione Scientifica e Disseminazione Sociale per la cura dei tumori cerebrali nella Sclerosi Tuberosa Complessa”

Descrizione dettagliata

Idea progettuale e contesto sociale

L'Associazione Sclerosi Tuberosa è impegnata sin dalla sua fondazione e come da suo primo scopo così come indicato nel suo statuto nel promuovere lo sviluppo e la diffusione della ricerca scientifica sulla sclerosi tuberosa.

Per la sua natura di associazione di malati rari e familiari, l'associazione rappresenta il filtro, la mediazione, il punto di contatto tra ricercatori e famiglie, tra la ricerca scientifica e la vita quotidiana degli affetti da sclerosi tuberosa e loro famiglie. L'associazione stessa è costituita in gran parte da familiari di affetti, per questo conosce benissimo l'esperienza e il tipo di relazione che si instaura tra famiglie con sclerosi tuberosa e ricerca scientifica. Da una parte, la ricerca è la speranza, e le famiglie affidano il loro futuro agli scienziati e alle nuove scoperte e cure che possono derivare dalle ricerche. Dall'altra parte, si percepisce anche una diffidenza dovuta alla scarsa comunicazione tra i due mondi: un linguaggio, quello scientifico, incomprensibile per la maggior parte delle famiglie, e la sensazione che i ricercatori possano anche in buona fede “approfittare” della condizione dei malati per lo sviluppo delle loro carriere. Questo progetto nasce proprio per abbattere questa diffidenza, che è nociva alla qualità della ricerca scientifica ma anche alla serenità stessa delle famiglie. Lo fa a partire dai contesti in cui l'associazione più rileva l'esistenza di questo gap tra famiglie e ricercatori, il centro-sud Italia che per ragioni storiche e di contesto economico e sociale e sanitario è ancora più svantaggiato nell'accesso alle informazioni scientifiche oltre che alle cure sanitarie e sociali.

In queste regioni ci sono meno presidi sanitari attrezzati, che si concentrano soprattutto al centro-nord, così come ci sono servizi sociali meno sviluppati ma anche sono assenti i luoghi della ricerca scientifica, solitamente localizzati nelle università e ospedali del centro-nord. Anche l'associazione stessa, per queste stesse ragioni, fatica di più ad arrivare in queste regioni.

Per questo è di importanza strategica fondamentale creare occasioni di conoscenza, scambio, disseminazione, partecipazione proprio nelle regioni del centro-sud come, in particolare: Lazio, Abruzzo, Molise, Puglia, Campania, Basilicata, Calabria.

Contesto scientifico

Background

La Sclerosi Tuberosa Complessa (TSC) è un disordine neurocutaneo, progressivo, ereditario, e multisistemico caratterizzato da lesioni istologiche benigne, gli amartomi, circoscritte in diversi organi: cervello, occhi, cuore, polmoni, reni e cute [1]. La TSC è una malattia genetica rara (Cod. esenz. per malattie rare SSN: RN0750), con una incidenza di 1 su 6000-7000 nati, a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata da penetranza completa ed espressività variabile [2].

La comparsa della malattia è determinata da mutazioni inattivanti uno dei due geni oncosoppressori TSC1 (cromosoma 9q34) o TSC2 (cromosoma 16p13.3), codificanti rispettivamente per le proteine amartina e tuberina [3]. Tali proteine costituiscono, insieme alla proteina TBC1D7, un complesso eteromero fondamentale nella regolazione negativa del

pathway della proteina conosciuta come *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR), una serina/treonina chinasi altamente conservata, coinvolta nel controllo del metabolismo cellulare, della sintesi proteica, della crescita, del differenziamento e della migrazione in risposta a nutrienti e fattori di crescita [4,5].

La TSC è associata a disordini neurologici e neuropsichiatrici ai quali ci si riferisce complessivamente con il termine TAND (*Tuberous sclerosis Associated Neuropsychiatric Disorders*). Mentre per i disordini neurologici si fa riferimento ad epilessia, ritardo mentale ed idrocefalo, tra i disturbi comportamentali rientrano: aggressività, ansia, depressione, autolesionismo, disturbi del sonno. Alla sfera prettamente psichiatrica appartengono l'autismo e la sindrome da deficit di attenzione e iperattività.

Tra le lesioni cerebrali in grado di spiegare la comparsa di tali manifestazioni rientrano l'insorgenza di displasia corticale (tuberi corticali e linee di migrazione radiale di sostanza bianca), la formazione di noduli subependimali (SEN) e di astrocitomi subependimali a cellule giganti (SEGA) [5, 6]. I SEN sono le lesioni cerebrali più comuni nella TSC (90% dei pazienti) e sono caratterizzati da cellule giganti e multinucleate (simili a quelle presenti nei tuberi), positive ai *marker* tipici di neuroni e glia, che si formano in corrispondenza della parete subependimale del ventricolo laterale. Si tratta di noduli asintomatici che possono calcificare o accrescersi gradualmente, fino a trasformarsi, entro la seconda decade di vita, in formazioni del diametro ≥ 15 mm. I SEGA, osservati nel 5-15% dei pazienti ed istologicamente non distinguibili dai SEN, sono classificati come astrocitomi benigni a lenta crescita, di grado I. Si presentano come formazioni unilaterali o bilaterali che ostruiscono il flusso del fluido cerebrospinale attraverso il forame di *Monro*, dove si localizzano, spiegando dunque la comparsa di idrocefalo e di sintomi legati all'aumento della pressione intracranica nei pazienti affetti da TSC (cefalea, diplopia, fotofobia, convulsioni e disturbi dell'umore) [5].

Negli ultimi anni la *Food and Drug Administration* ha approvato everolimus, un derivato della rapamicina, per il trattamento dei SEGA e altre manifestazioni della TSC [7,8,9]. Il trattamento dei SEGA con everolimus si è dimostrato un'arma fondamentale per la riduzione della dimensione dell'astrocitoma, ma sfortunatamente è stato associato ad un significativo rischio di effetti collaterali legati all'azione degli inibitori di mTOR sul sistema immunitario [10].

Nel 2011 il gruppo del Prof. Parada [11] ha dimostrato che la perdita di funzionalità del gene *Tsc1* nelle cellule neurali staminali adulte (aNSC) può portare allo sviluppo di strutture SEGA-simili che si formano nei ventricoli dei modelli murini condizionali di TSC (*Tsc1^{loxP}/Nestin-cre/ERT2/Rosa26- β -Gal*). La perdita di funzionalità del gene *Tsc1* porta ad una aumentata capacità di aggregazione e ad una diminuita capacità di migrazione delle aNSC lungo la *rostral migratory stream*. Ciò causa un accumulo di tali cellule nella SVZ che cresce nel tempo dando origine prima ai SEN e successivamente, in alcuni casi, ai SEGA.

Risultati scientifici preliminari

Il gruppo di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università Degli Studi di Perugia, Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, guidato dalla Prof.ssa Carla Emiliani, ha individuato un nuovo meccanismo molecolare difettoso alla base del difetto di migrazione delle aNSC. I risultati di questa scoperta sono stati pubblicati dalla rivista dell'Università di Oxford a Giugno 2017 [12]. Il lavoro scientifico è stato finanziato, oltre che con fondi propri del gruppo di ricerca della Prof. Carla Emiliani, anche con fondi dell'Associazione Italiana Sclerosi Tuberosa.

Nel laboratorio in questione è stato dapprima creato un modello cellulare di TSC ristretto al sistema nervoso centrale. Grazie all'utilizzo di modelli murini condizionali di TSC sono state isolate le cellule staminali neurali adulte (aNSC) nelle quali è stato poi inattivato il gene *Tsc1* mediante l'utilizzo di tecniche avanzate di biologia molecolare. Il modello cellulare aNSC *Tsc1* deficiente

presentava un'iperattivazione del pathway di mTOR che caratterizza la malattia. Inoltre, grazie a studi più approfonditi, è stato individuato un difetto nell'attivazione del fattore di trascrizione EB (TFEB), un *master gene* per il controllo della funzione dei lisosomi e del processo autofagico [13].

A questo punto è stato messo a punto un saggio di migrazione *in vitro* che ha messo in evidenza il difetto di migrazione delle aNSC Tsc1 deficienti, e ci ha permesso di capire che l'alterazione è legata ad un difetto specifico delle cellule anche fuori dal complesso sistema d'organo dove queste risiedono [14]. Le cellule sono state poi trattate con il farmaco everolimus che ha portato alla correzione del difetto di migrazione oltre che ad una riduzione dell'iperattività di mTOR con la conseguente riduzione della proliferazione cellulare. La regolazione di TFEB dipende dal pathway di mTOR. In condizioni normali mTORC1 fosforila TFEB sopprimendo la sua attività trascrizionale mantenendolo nel citoplasma. Quando mTORC1 è inattivato da condizioni di mancanza di nutrienti o mediante l'uso di inibitori specifici, TFEB non viene fosforilato e può traslocare nel nucleo cellulare promuovendo la trascrizione dei geni target tra i quali noi ipotizziamo ci siano anche geni coinvolti nella migrazione cellulare. E' infatti già noto un collegamento tra l'attivazione di TFEB e un aumento delle capacità migratorie di altre tipologie cellulari [15, 16].

Nel 2017 Zhang e collaboratori hanno dimostrato che la curcumina, un polifenolo naturale estratto dalla *Curcuma longa*, è in grado di attivare la traslocazione di TFEB senza alterare l'attività di mTOR in cellule Tsc2 deficienti [17]. Abbiamo perciò messo a punto un esperimento di migrazione trattando le aNSC Tsc1 deficienti con la curcumina, la quale ha consentito il ripristinato della migrazione delle cellule, in modo del tutto analogo ad everolimus, senza però alterare il pathway di mTOR.

I risultati del nostro lavoro hanno pertanto permesso di individuare un difetto di attivazione di TFEB nelle cellule Tsc1 deficienti che può essere corretto mediante l'utilizzo di attivatori di TFEB come la curcumina o di analoghi della curcumina che legano direttamente TFEB, senza alterare il pathway di mTOR.

Tali risultati pongono le basi per la messa a punto di una nuova strategia terapeutica che può sostituire o coadiuvare la terapia classica per il trattamento dei SEGA evitando gli effetti collaterali tipici verso il sistema immunitario causati dall'uso degli inibitori di mTOR.

Finalità

Finalità generale del progetto è contribuire allo sviluppo e alla divulgazione della ricerca scientifica sulla Sclerosi Tuberosa. Questo obiettivo generale si declina in due obiettivi specifici.

Obiettivi specifici

Obiettivo 1: Offrire un contributo scientifico per la cura di pazienti affetti da TSC mediante lo sviluppo di un nuovo protocollo terapeutico per il trattamento dell'astrocitoma a cellule giganti.

L'obiettivo scientifico del progetto è quello di effettuare uno studio pre-clinico volto a sviluppare un nuovo protocollo terapeutico per la cura degli astrocitomi subependimali a cellule giganti (SEGA) nei pazienti affetti da TSC, addizionale o alternativo all'uso degli inibitori di mTOR, i quali provocano effetti- collaterali notevoli quando somministrati cronicamente a causa della loro azione immunosoppressiva. L'obiettivo terapeutico è quello di ripristinare la migrazione delle aNSC Tsc1 deficienti mediante l'impiego di attivatori di TFEB mTOR indipendenti. L'uso di questi farmaci è mirato a prevenire e/o a ridurre la formazione dei SEGA evitando gli effetti collaterali che insorgono durante le terapie basate sull'impiego degli inibitori di mTOR. In particolare, verranno utilizzati la curcumina e l'analogo della curcumina (1E,4E)-1,5-Bis(2-methoxyphenyl)penta-1,4-

dien-3-one [C1; 18], già testati nei nostri laboratori su diversi modelli cellulari, per il trattamento di modelli murini condizionali di TSC (Tsc1^{loxP}/Nestin-cre/ERT2/Rosa26YFP). Le attività di ricerca previste dal progetto si articoleranno in due diversi protocolli di somministrazione finalizzati a valutare se il trattamento con gli attivatori di TFEB può essere proposto come protocollo preventivo, sia come trattamento capace di portare alla riduzione, e nella migliore delle ipotesi, alla scomparsa dei SEGA.

Il progetto si propone altresì di perseguire un secondo obiettivo scientifico specifico che consiste nella progettazione di attivatori di TFEB mediante studi di *docking* molecolare, al fine di sviluppare molecole capaci di attivare direttamente TFEB con un meccanismo mTOR indipendente. Le molecole così individuate saranno sintetizzate e testate su modelli cellulari overesprimenti TFEB già presenti nei nostri laboratori. Le molecole che dimostreranno di avere una alta efficienza nell'indurre l'attivazione di TFEB saranno testate anche per valutare la loro capacità di ripristinare la migrazione delle aNSC Tsc1 deficienti. Poiché l'attivazione di TFEB induce autofagia, le molecole di interesse saranno analizzate per la loro efficacia nello stimolare i processi autofagici che sono ormai noti essere protettivi contro le malattie neurodegenerative e contro l'invecchiamento. La/e molecola/e che dimostreranno di avere effetti positivi sui meccanismi indicati saranno sottoposte a brevetto per il trattamento della TSC e come molecole *anti-aging*.

Obiettivo 2: Favorire la crescita di consapevolezza e cultura scientifica sulla TSC presso le famiglie di pazienti affetti e la collettività in un'ottica di promozione della solidarietà e di prevenzione con particolare riferimento ai contesti territoriali del centro-sud Italia.

Come già indicato le regioni del centro-sud Italia sono svantaggiate dal punto di vista dell'accesso ai risultati di ricerca e, di conseguenza, anche alle cure in quanto ci sono meno presidi sanitari attrezzati rispetto alle regioni del centro-nord. È importante quindi dedicare un'attenzione speciale alla disseminazione sociale dei risultati delle ricerche proprio in questi contesti territoriali, diffondendo informazione non fine a se stessa ma utile a migliorare la consapevolezza dei soggetti affetti da sclerosi tuberosa e loro familiari rispetto alla loro condizione, alle cure possibili e agli scenari futuri.

Risultati attesi e benefici sulla comunità di riferimento

Il progetto si propone, grazie alla collaborazione tra Terzo Settore e Attori della Ricerca scientifica, il raggiungimento dei seguenti risultati attesi/benefici:

1) Messa a punto di un protocollo terapeutico preclinico per la cura di tumori cerebrali nella TSC e sviluppo di farmaci con ridotti effetti collaterali.

Lo scopo del progetto è quello di proporre un nuovo protocollo terapeutico per il trattamento dei SEGA nei pazienti affetti da Sclerosi Tuberosa Complessa, in grado di sostituire o coadiuvare la terapia classica e di evitare pertanto gli effetti collaterali sul sistema immunitario causati dall'utilizzo degli inibitori di mTOR. I beneficiari finali del progetto sono pertanto i pazienti affetti da TSC, che, come detto in apertura è una malattia genetica rara a trasmissione autosomica dominante che presenta un'incidenza di 1 su 6000-7000 nati.

Tenuto perciò conto degli strumenti a nostra disposizione, tra i quali la disponibilità dei modelli murini condizionali di TSC, delle molecole da utilizzare per i trattamenti già presenti nei nostri laboratori e delle competenze acquisite sullo studio dei meccanismi molecolari della malattia, dal progetto ci aspettiamo di ottenere, in tempi brevi, evidenze dell'efficacia del trattamento da noi proposto nel modello murino della TSC. Ci aspettiamo che tali trattamenti portino ad un

miglioramento delle funzioni cognitive dei topi TSC e, soprattutto, alla riduzione delle dimensioni dei SEGA. Inoltre, ci si aspetta che nei topi trattati con C1 l'attività del pathway di mTOR a livello sistemico, e nello specifico nelle cellule del sistema immunitario, rimanga inalterata, senza perciò la conseguente comparsa degli effetti collaterali riscontrabili nel caso dell'utilizzo degli inibitori di mTOR.

Inoltre, grazie agli studi di *docking* molecolare, ci aspettiamo di individuare nuove molecole in grado di legare TFEB con elevata affinità, promuovendo la sua traslocazione nucleare e l'attivazione trascrizionale dei suoi geni target. Questo potrà condurci a brevettare nuove molecole per la cura dei pazienti TSC basata sulla riduzione delle dimensioni e della formazione dei SEGA. Poiché è noto che l'attivazione di TFEB induce un aumento dell'attività autofagica, le molecole da noi individuate potranno rivelarsi utili anche nel trattamento delle malattie neurodegenerative e come molecole anti-aging. Questa prospettiva amplia notevolmente la possibilità di applicazione dello studio proposto in quanto consentirà non solo un passo avanti nella terapia di una malattia rara quale la TSC, ma pone le basi per un possibile trattamento di tutte quelle malattie associate all'età che sempre di più affliggono una società in cui l'aspettativa di vita è in continuo aumento grazie al progresso tecnologico e al miglioramento della qualità della vita.

2) Accresciuta consapevolezza scientifica presso famiglie e collettività, in un'ottica di promozione della cultura della solidarietà e di prevenzione, con particolare attenzione alle regioni del sud Italia.

Dal punto di vista sociale, ci si aspetta che, grazie all'attività di disseminazione, circa 200 famiglie e persone interessate vengano raggiunte dall'attività divulgativa nel centro-sud, vengano informate sui risultati della ricerca, e più in generale sviluppino un rapporto positivo con la ricerca scientifica, una maggiore cultura scientifica e una crescita di consapevolezza rispetto al funzionamento delle pratiche di ricerca, dei tempi, e del possibile impatto sulla loro vita quotidiana.

Attività

Il progetto prevede lo svolgimento di due macro-attività, una di carattere scientifico e una di carattere sociale divulgativo. Nello specifico le attività previste sono le seguenti:

1. Sviluppo di un progetto di ricerca sperimentale articolato in due fasi:
 - a. fase pre-clinica su modelli murini condizionali di TSC;
 - b. fase di drug design finalizzata allo sviluppo di nuove molecole per la cura dei tumori cerebrali con effetti collaterali ridotti rispetto alla terapia classica con inibitori di mTOR;
2. Realizzazione di incontri informativi e seminari di divulgazione scientifica rivolti alle famiglie di pazienti affetti da TSC nel centro-sud Italia.

Attività 1: Progetto di ricerca sperimentale

Le attività sperimentali di progetto saranno sviluppate da un gruppo di ricercatori con competenze multidisciplinari e complementari, afferenti all'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena di Roma e all'Università degli Studi di Perugia, tra i quali esiste una collaborazione scientifica consolidata e pluriennale nel settore dello studio di malattie rare e neurodegenerative, con particolare riferimento alla Sclerosi Tuberosa Complessa.

Il piano sperimentale di lavoro si articolerà in due fasi principali:

1. Fase pre-clinica sui modelli murini condizionali di TSC;
2. Fase di *drug design* finalizzata allo sviluppo di nuove molecole attivatrici di TFEB.

1. La fase di ricerca pre-clinica sui modelli murini condizionali di TSC sarà sviluppata in collaborazione dall'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena di Roma (IRE) e dall'Università di Perugia. In particolare, componenti del gruppo di ricerca operanti presso l'IRE sono il Dott. Diego Dolcetta, specializzato in Neurologia, e il Dott. Federico De Marco, specializzato nel trattamento dei modelli murini.

Attualmente presso l'IRE è presente una colonia di topi $Tsc1^{loxP}/Nestin-cre/ERT2/Rosa26YFP$ (topi Tsc1) che può essere amplificata per procedere con gli studi *in vivo* previsti nel progetto di ricerca. I topi condizionali Tsc1 si sviluppano in modo corretto e non presentano alcun sintomo della malattia. La rimozione del gene Tsc1 nelle aNSC può essere indotta mediante il trattamento con il farmaco Tamoxifene che induce l'attivazione della ricombinasi Cre. Il trattamento con il farmaco oltre a causare il blocco dell'espressione del gene Tsc1 induce anche la produzione della proteina YFP. In questo modo le aNSC Tsc1 deficienti possono essere individuate facilmente mediante microscopia a fluorescenza. La colonia murina è già stata genotipizzata presso il laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università di Perugia che è dotato di tutto il materiale e la strumentazione necessari per lo screening genomico della prole, al fine di poter disporre sempre degli esemplari del modello animale necessari per lo studio in questione. Il team di ricerca è composto di 3 ricercatori con il coordinamento e supervisione della Prof.ssa Carla Emiliani, che ha già conseguito importanti risultati nel settore di riferimento facendo luce su un importante meccanismo molecolare alla base del difetto di migrazione delle aNSC Tsc1 deficienti e alla correzione di questo difetto mediante l'utilizzo della curcumina.

Una volta ottenuto un numero adeguato di topi TSC1, verrà effettuato il trattamento farmacologico con tamoxifene in topi di quindici giorni di età (P15). I topi saranno trattati con tamoxifene (dose: 75 mg/kg/24h per 5 giorni) seguendo il protocollo indicato dalla *Jackson Laboratory leader* nella produzione e commercializzazione di modelli murini per la ricerca scientifica (Protocollo: *Intraperitoneal Injection of Tamoxifen for Inducible Cre-Driver Lines*: <https://www.jax.org/research-and-faculty/tools/cre-repository/tamoxifen>). I topi condizionali di Tsc1 sono in grado di sviluppare SEGA dopo due mesi dalla fine della somministrazione di tamoxifene [11].

La somministrazione di everolimus, curcumina e C1 sarà effettuata usando due diversi protocolli.

- Protocollo preventivo (numerosità di 20 topi, 5 topi per ogni farmaco più cinque topi controllo): il giorno successivo dalla fine della somministrazione con tamoxifene, i topi saranno trattati con everolimus (5 mg/kg), curcumina (25 mg/kg), C1 (10 mg/kg) e, come controllo, con la soluzione di solubilizzazione dei farmaci (Veicolo). Il periodo di trattamento previsto è di 30 giorni con una somministrazione a cadenza giornaliera mediante sonda gastrica. Durante il trattamento, alla fine della prima settimana, due topi per ogni gruppo saranno sacrificati per valutare la concentrazione dei farmaci nel sangue e nel cervello. L'analisi sarà condotta dal Prof. Stefano Giovagnoli con il quale è già stata messa a punto l'analisi HPLC di everolimus nel sangue di topi trattati [19]. Inoltre, sui cervelli murini, sarà effettuata l'analisi biochimica per valutare il pathway di mTORC1/TEFB e i marcatori autofagici LC3BII e p62/SQSTM1.
- Protocollo terapeutico (numerosità come sopra): dopo due mesi dal termine della somministrazione di tamoxifene, i topi saranno trattati con everolimus (5 mg/kg), curcumina (25 mg/kg), C1 (10 mg/kg) e, come controllo, con la soluzione di solubilizzazione dei farmaci (Veicolo). Il periodo di trattamento previsto è di 30 giorni con somministrazioni giornaliere. Durante il trattamento, alla fine della prima settimana, due topi per ogni gruppo saranno sacrificati per valutare la concentrazione dei farmaci nel sangue.

Alla fine dei trattamenti, in entrambi i casi, i topi saranno sacrificati e il cervello e alcuni organi periferici (fegato e milza) saranno recuperati e trattati in modo opportuno per le analisi biochimiche e l'analisi istologica, che si avvarrà dell'aiuto della Dott. Giuseppina Mariucci già

responsabile di numerosi progetti nel campo delle neuroscienze e con competenze specifiche nell'analisi dei tessuti cerebrali anche mediante l'uso di tecniche di immunistochemica e immunofluorescenza. I tessuti cerebrali fissati saranno sezionati e le fettine istologiche saranno colorate mediante ematossilina-eosina per l'analisi della numerosità e delle dimensioni delle strutture SEGA-like. Inoltre, una parte delle fettine sarà usata per l'analisi di immunofluorescenza allo scopo di evidenziare le cellule Tsc1 deficienti grazie alla loro capacità di esprimere la proteina YFP. Questo ci consentirà di effettuare una analisi specifica della migrazione delle aNSC lungo la *rostral migratory stream* per verificare se il ripristino di una corretta migrazione è associato ad un aumento del numero di cellule Tsc1 deficienti nei bulbi olfattivi e ad una riduzione delle dimensioni dei SEGA. Il fegato e la milza saranno utilizzati per valutare l'effetto dei farmaci sull'attività di mTOR nei tessuti periferici.

2. La fase di *drug design* prevista dal piano sperimentale di progetto è finalizzata alla progettazione di nuove molecole attivatrici di TFEB. A tale scopo verranno effettuati studi di *docking* molecolare utilizzando la sequenza aminoacidica di TFEB e le strutture tridimensionali della famiglia di proteine MiT/TFE alla quale TFEB appartiene. I possibili candidati attivatori di TFEB saranno sintetizzati presso i laboratori di Chimica Organica del Dip. di Chimica, Biologia e Biotecnologie e saranno poi testati su modelli cellulari overesprimenti TFEB già presenti nei nostri laboratori [20]. L'analisi verrà condotta sia mediante esperimenti di immunofluorescenza, che mediante immunoblotting sulla frazione nucleare delle cellule trattate, utilizzando anticorpi specifici contro TFEB. Sempre mediante immunoblotting sarà valutata l'attività di mTOR andando a determinare i livelli di fosforilazione delle proteine p70S6K, S6 e 4EBP1, che sono i target diretti del complesso mTORC1. Le molecole che dimostreranno di avere un'alta efficienza nell'indire l'attivazione di TFEB con un meccanismo mTOR indipendente saranno testate anche per la loro azione nel ripristinare la migrazione delle aNSC Tsc1 deficienti e nello stimolare i processi autofagici. La/e molecola/e che dimostreranno di avere effetti positivi sui meccanismi indicati saranno sottoposte a brevetto per il trattamento della TSC e come molecole *anti-aging*.

Attività 2: Incontri informativi e seminari di divulgazione

La disseminazione sociale dell'attività scientifica avviene tramite lo svolgimento di seminari di divulgazione in tre regioni del centro-sud: Lazio, Campania, Puglia. I seminari verranno organizzati dalle sezioni locali dell'Associazione Sclerosi Tuberosa e prevedono la partecipazione di famiglie di persone con sclerosi tuberosa provenienti da tutta la regione e dalle regioni limitrofe (circa 50-100 persone per ciascun seminario), con la presenza di un ricercatore impegnato nella ricerca e di un facilitatore dell'Associazione Sclerosi Tuberosa. Nello specifico sono previsti tre seminari di divulgazione nella seconda metà del progetto così distribuiti:

- Regione Lazio: parteciperanno famiglie di persone affette da sclerosi tuberosa delle regioni Lazio, Abruzzo, Molise, Umbria.
- Regione Campania: parteciperanno famiglie di persone affette da sclerosi tuberosa dalle regioni Campania, Basilicata, Calabria, Molise.
- Regione Puglia: parteciperanno famiglie di persone affette da sclerosi tuberosa dalle regioni Puglia, Abruzzo, Molise, Basilicata.

Referenze scientifiche

- [1] Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008 Aug 23;372(9639):657-68. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61279-9. Review.
- [2] Crino, P.B., Nathanson, K.L. and Henske, E.P. (2006) The tuberous sclerosis complex. *N. Engl. J. Med.*, 355, 1345-1356.
- [3] Tee, A.R., Fingar, D.C., Manning, B.D., Kwiatkowski, D.J., Cantley, L.C. and Blenis, J. (2002) Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13571-13576.
- [4] Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell*. 2012 Aug 24;47(4):535-46. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.009. Epub 2012 Jul 12.
- [5] Curatolo P, Moavero R, Roberto D, Graziola F. Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex. *Semin Pediatr Neurol*. 2015 Dec;22(4):259-73. doi: 10.1016/j.spen.2015.10.002. Epub 2015 Oct 21. Review.
- [6] Marcotte, L. and Crino, P.B. (2006) The neurobiology of the tuberous sclerosis complex. *Neuromolecular. Med.*, 8, 531-546.
- [7] Franz, D.N., Leonard, J., Tudor, C., Chuck, G., Care, M., Sethuraman, G., Dinopoulos, A., Thomas, G. and Crone, K.R. (2006) Rapamycin causes regression of astrocytomas in tuberous sclerosis complex. *Ann. Neurol.*, 59, 490-498. 9.
- [8] Krueger, D.A., Care, M.M., Holland, K., Agricola, K., Tudor, C., Mangeshkar, P., Wilson, K.A., Byars, A., Sahmoud, T. and Franz, D.N. (2010) Everolimus for subependymal giantcell astrocytomas in tuberous sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 363, 1801-1811.
- [9] AFINITOR DISPERZ (everolimus tablets for oral suspension) [prescribing information] (2014) East Hanover, NJ, Novartis Pharmaceuticals Corporation, AFINITOR® (everolimus) tablets for oral administration.
- [10] Franz, D.N., Belousova, E., Sparagana, S., Bebin, E.M., Frost, M., Kuperman, R., Witt, O., Kohrman, M.H., Flamini, J.R., Wu, J.Y. et al. (2013) Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, 381, 125-132.
- [11] Zhou J., Shrikhande, G., Xu, J., McKay, R.M., Burns, D.K., Johnson, J.E. and Parada, L.F. (2011) Tsc1 mutant neural stem/progenitor cells exhibit migration deficits and give rise to subependymal lesions in the lateral ventricle. *Genes Dev.*, 25, 1595-1600.
- [12] Magini A, Polchi A, Di Meo D, Mariucci G, Sagini K, De Marco F, Cassano T, Giovagnoli S, Dolcetta D, Emiliani C. TFEB activation restores migration ability to Tsc1-deficient adult neural stem/progenitor cells. *Hum Mol Genet*. 2017 Jun 14. doi: 10.1093/hmg/ddx214.
- [13] Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S. et al. (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 325, 473-7.
- [14] Mobley, A.K. and McCarty, J.H. (2011) $\beta 8$ Integrin is Essential for Neuroblast Migration in the Rostral Migratory Stream. *Glia*, 59, 1579-1587.
- [15] Giatromanolaki, A., Kalamida, D., Sivridis, E., Karagounis, I.V., Gatter, K.C., Harris, A.L. and Koukourakis, M.I. (2015) Increased expression of transcription factor EB (TFEB) is associated with autophagy, migratory phenotype and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 90, 98-105.
- [16] Petri, R., Pircs, K., Jönsson, M.E., Åkerblom, M., Brattås, P.L., Klussendorf, T. and Jakobsson, J. (2017) Let-7 regulates radial migration of new-born neurons through positive regulation of autophagy. *EMBO J*. Mar 23. pii: e201695235.

-
- [17] Zhang, J., Wang, J., Xu, J., Lu, Y., Jiang, J., Wang, L., Shen, H.M. and Xia, D. (2016). Curcumin targets the TFEB-lysosome pathway for induction of autophagy. *Oncotarget*. 2016 Nov 15;7(46):75659-75671. doi: 10.18632/oncotarget.12318.
- [18] Song JX, Sun YR, Peluso I, Zeng Y, Yu X, Lu JH, Xu Z, Wang MZ, Liu LF, Huang YY, Chen LL, Durairajan SS, Zhang HJ, Zhou B, Zhang HQ, Lu A, Ballabio A, Medina DL, Guo Z, Li M. *Autophagy*. 2016 Aug 2;12(8):1372-89. doi: 10.1080/15548627.2016.1179404. Epub 2016 May 12.
- [19] Giovagnoli S, Cassano T, Pace L, Magini A, Polchi A, Tancini B, Perluigi M, De Marco F, Emiliani C, Dolcetta D. Evaluation of a LC-MS method for everolimus preclinical determination in brain by using [(13)C2D4]RAD001 internal standard. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015 Mar 15;985:155-63. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.01.035. Epub 2015 Feb 3.
- [20] Magini, A., Polchi, A., Urbanelli, L., Cesselli, D., Beltrami, A., Tancini, B. and Emiliani, C. (2014) TFEB activation promotes the recruitment of lysosomal glycohydrolases β -hexosaminidase and β -galactosidase to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 440, 251-257.