

## Poster P.01.5

### A POSSIBLE STRATEGY TO INDUCE EXON 45 SKIPPING IN DMD-D44 PATIENTS THROUGH THE MODULATION OF CELF2A SPLICING FACTOR

**Martone J.\*<sup>[1]</sup>**, Lisi M.<sup>[1]</sup>, Castagnetti F.<sup>[1]</sup>, Rosa A.<sup>[2]</sup>, Di Carlo V.<sup>[3]</sup>, Sthandier O.<sup>[1]</sup>, Di Croce L.<sup>[3]</sup>, Bozzoni I.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Biology and Biotechnology Charles Darwin, Sapienza University of Rome, Italy ~ Rome ~ Italy, <sup>[2]</sup>Center for Life Nano Science@Sapienza, Istituto Italiano di Tecnologia, Rome, Italy ~ rome ~ Italy, <sup>[3]</sup>Centre for Genomic Regulation, The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain. ~ Barcelona ~ Spain

We previously characterized a Duchenne Muscular Dystrophy patient (GS $\square$ 44), carrying the deletion of exon 44, who showed a milder phenotype than expected for a Duchenne patient. We showed that GS $\square$ 44 produces 7% of dystrophin thanks to the ability to undergo endogenous exon 45 skipping which enables the formation of a mRNA with a restored ORF (fusion of ex 43-46). Exon 45 skipping correlated with the lack of Celf2a, a muscle specific isoform of the Celf2 splicing factor, which was shown to bind the exon 45 region and to be important for its efficient inclusion in the mature mRNA. Moreover, the expression of Celf2a was absent in myocytes derived from fibroblast obtained from the mother of GS $\square$ 44, suggesting the hereditary transmission of Celf2a silencing.

Following experiments allowed us to show that CRISPR/Cas9 inactivation of Celf2a, in myocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) of an unrelated patient carrying a  $\square$ 44 deletion, produced skipping of exon 45, indicating that ablation of this factor could be curative for all those cases where skipping of exon 45 can recover a functional ORF. We also show that the lack of Celf2a expression in the GS $\square$ 44 patient is due to an epigenetic control mediated by a chromatin-associated lncRNA. This RNA, while expressed in GS $\square$ 44, is instead absent in control myoblasts. Interestingly, depletion of this lncRNA in GS $\square$ 44 myoblasts rescued Celf2a expression, while its overexpression in control myoblasts repressed it.

La Distrofia muscolare di Duchenne è una malattia rara caratterizzata da una progressiva degenerazione muscolare dovuta all'assenza di una proteina nota come Distrofina. I pazienti affetti da questa patologia perdono la capacità di camminare intorno ai 14 anni ed in genere la morte sopraggiunge durante la terza/quarta decade di vita a causa di arresto cardiaco o insufficienza respiratoria. Partendo dall'osservazione che alcuni pazienti mostrano un fenotipo più lieve, abbiamo deciso di investigare le "cause molecolari" di questo miglioramento per capire se queste "modifiche" potessero essere utili per migliorare le condizioni di vita di altri pazienti affetti dalla stessa patologia. Analizzando nel dettaglio un singolo paziente abbiamo identificato una proteina, CELF2a, la cui assenza consente al paziente in esame di produrre un pò di Distrofina, determinando così un fenotipo più lieve. Abbiamo in seguito studiato l'effetto dell'eliminazione di CELF2a sulla produzione della proteina Distrofina in cellule muscolari derivate da un altro individuo affetto da Duchenne. Effettivamente l'eliminazione di CELF2a ha consentito di ripristinare la produzione di Distrofina, seppur in bassa percentuale. Questi dati suggeriscono che in una sottopopolazione di pazienti, ovvero quelli caratterizzati da mutazioni nel gene della Distrofina che risultano curabili tramite l'eliminazione dell'esone 45, l'inibizione di CELF2a potrebbe avere un effetto terapeutico sia da solo che in combinazione con altre strategie. Abbiamo inoltre identificato il meccanismo molecolare che determina la mancanza di CELF2a nel paziente iniziale. In particolare, l'assenza di questa proteina non è dovuta a mutazioni di questo gene ma ad alterazioni nella sua regolazione.

Martone J, Briganti F, Legnini I, Morlando M, Picillo E, Sthandier O, Politano L, Bozzoni I. The lack of the Celf2a splicing factor converts a Duchenne genotype into a Becker phenotype. Nat Commun. (2016) 7:10488.

Distrofia Muscolare di Duchenne

Coordinator: Irene Bozzoni

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GPP16213

**Disease Name:**

Duchenne Muscular Dystrophy

**Keywords:**

Duchenne muscular Dystrophy, Splicing and exon skipping, Epigenetic control