

Poster P.01.9

GENE EDITING IN MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1: ASSESSMENT OF EFFICIENCY, SAFETY AND THERAPEUTIC EFFECT OF CTG-REPEAT DELETION IN A MOUSE MODEL OF DISEASE

Provenzano C.^[1], Cardinali B.^[1], Perfetti A.^[2], Mandillo S.^[1], Golini E.^[1], Strimpakos G.^[1], Voellenkle C.^[2], Longo M.^[2], Martelli F.^[2], **Falcone G.*^[1]**

^[1]*Institute of Cell Biology and Neurobiology, National Research Council ~ Monterotondo (RM) ~ Italy*, ^[2]*Molecular Cardiology Laboratory, IRCCS-Policlinico San Donato ~ San Donato Milanese (MI) ~ Italy*

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a dominantly inherited, multisystemic disorder caused by expanded CTG repeats in the 3' untranslated region (3'UTR) of the DMPK gene. DM1 is the most common adult-onset muscular dystrophy characterized by progressive skeletal muscle weakness, myotonia, cardiac arrhythmia, smooth muscle dysfunction and neurological abnormalities. DMPK mutated transcript accumulates into nuclear foci that affect the localization and activities of RNA-binding proteins involved in splicing regulation. To date no effective therapy is yet available for DM1.

A direct genomic approach for treating an autosomal dominant gain-of-function disease such as DM1 is the removal of the mutated gene region. The multiplex capability of CRISPR/Cas9 gene editing allows the deletion of unwanted genomic sequences by eliciting two simultaneous double-strand breaks. Having already generated and tested highly specific and inducible CRISPR/Cas9 components in DM1 patient-derived cells, we plan to apply this gene editing strategy in DMSXL mice in vivo with the ultimate goal to obtain the permanent elimination of the genetic defect and the reversal of the diseased phenotype. These transgenic mice carry a mutated human DMPK gene and exhibit a pathologic neuromuscular phenotype similar to that observed in human DM1 disease. The CRISPR/Cas9 components will be delivered systemically into diseased animals by using Adeno-Associated Viral vectors and gene editing in striated muscle and brain will be assessed. Editing efficiency and specificity in the different tissues will be precisely determined by ddPCR and deep sequencing of in-target and potential off-target genomic regions. Recovery from the disease following deletion of CTG repeats will be assessed by molecular analysis (foci and splicing) and behavioral tests in treated animals. Satellite cells are a crucial therapeutic target in DM1. Characterization of gene editing efficiency in muscle satellite cells will be performed in CRISPR/Cas9-treated animals. Moreover, the transcriptomic changes induced by CTGn-expansion expression and their anticipated reversion induced by CTGn-editing will be assessed by single cell RNA-sequencing.

This project is based upon and is a logical continuation of our previous research achievements. Specifically, it proposes to progress from in vitro studies to in vivo application, necessary to acquire the essential preclinical efficacy and safety data for future application in human patients.

Terapia genica nella Distrofia Miotonica di tipo 1: studio dell'efficienza, specificità ed effetto terapeutico della delezione delle espansioni di CTG in un modello murino della patologia

La distrofia miotonica di tipo 1 (DM1) è una malattia ereditaria che coinvolge diversi organi del corpo; i sintomi includono miotonia, debolezza muscolare, difetti cardiaci, cataratta oculare e disfunzioni neurologiche. La DM1 è causata da un difetto genetico che consiste nell'amplificazione anomala della sequenza di tre nucleotidi (CTG) nel gene DMPK, che codifica per una proteina chinasi della miosina particolarmente espressa nel tessuto muscolare e nervoso. La patologia è causata dalla tossicità delle

molecole di RNA difettose prodotte dal gene DMPK che, in conseguenza all'alterazione genetica, acquisiscono localizzazione e funzione anomale all'interno del nucleo della cellula. Nelle cellule dei pazienti affetti da DM1, l'RNA difettoso si accumula in aree nucleari caratteristiche chiamate foci e pertanto non può essere tradotto in proteina. Inoltre, queste molecole di RNA sequestrano nei foci nucleari importanti proteine coinvolte nella regolazione del processo di maturazione della maggior parte degli RNA cellulari. Ad oggi, non sono disponibili trattamenti specifici per la DM1. Il nostro progetto si concentra sull'applicazione di un metodo di terapia genica in un modello animale di DM1, che porterà all'eliminazione permanente del difetto genetico. Ciò sarà possibile mediante una potente tecnologia recentemente sviluppata, progettata per eliminare in maniera specifica le regioni di DNA difettose e ripristinare la normale funzione genica. Utilizzando questa strategia abbiamo già ottenuto con successo la rimozione del difetto genetico nelle cellule dei pazienti affetti da DM1. La nostra ricerca consentirà di trasferire la metodologia già applicata sulle cellule in vitro al modello animale in vivo, un passaggio indispensabile della fase preclinica per acquisire i dati di efficacia e sicurezza della terapia essenziali per la futura applicazione nel paziente.

Provenzano C, Cappella M, Valaperta R, Cardani R, Meola G, Martelli F, Cardinali B, Falcone G. CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of CTG Expansions Recovers Normal Phenotype in Myogenic Cells Derived from Myotonic Dystrophy 1 Patients. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Dec 15;9:337-348

Distrofia Miotonica di tipo 1

Coordinator: Germana Falcone

Partner: Fabio Martelli

Duration (N. Years): 3

Starting Year: 2019

Telethon Project (nr):

GGP19035

Disease Name:

Myotonic Dystrophy Type 1

Keywords:

Myotonic dystrophy type 1, CRISPR/Cas9, gene therapy