

Poster P.02.17

CLINICAL, MOLECULAR AND PATHOGENETIC STUDIES OF NEUTRAL LIPID STORAGE DISEASE (NLSD)

Tavian D.^[3], Pennisi E.M.^[1], Musarò A.^[2], Arca M.^[2], Angelini C.^[4]

^[1]San Filippo Neri Hospital ~ Roma ~ Italy, ^[2]Sapienza Università di Roma ~ Roma ~ Italy, ^[3]Università Cattolica ~ Milano ~ Italy, ^[4]S. Camillo Hospital ~ Padova ~ Italy

Neutral Lipid Storage Disease (NLSD) is a clinically heterogeneous group of non-lysosomal rare inherited disorders caused by mutations in ATGL-coding gene (PNPLA2) and its activator (ABHD5/CGI-58). NLSD expresses as NLSD with myopathy (NLSD-M) and NLSD with ichthyosis (NLSD-I). NLSD arises from a defect of triglyceride (TAG)-containing lipid droplets metabolism, leading to a systemic increase in the size and number of these cytosolic inclusions.

Within the activity of this project, 17 NLSD-M and 6 NLSD-I, along with the ATGL-KO mouse model, were evaluated. In NLSD-M patients, the prevalent symptom was weakness, while myalgia or cramps were present in 50% of them. Muscle atrophy was detected in 10 NLSD-M and in 3 NLSD-I patients. Proximal arms and leg muscles were mainly involved. Ichthyosis was present in all NLSD-I and in one NLSD-M patients. Two NLSD-I patients showed hepatic involvement. One NLSDM patient presented respiratory failure. Serum CK levels were high in all NLSD-M and in 30% of NLSD-I. The mean delay from the onset of clinical signs to diagnosis was 16.7 years. During follow-up, 3 patients died: 2 NLSD-I, because of fatal hepatic failure and 1 NLSD-M, probably due to heart damage; 6 lost their ability to walk. Two NLSD-M patients were implanted with a cardiac device owing to severe arrhythmias.

In NLSD-M patients, 16 different PNPLA2 mutations were identified; 8 patients were homozygotes and 9 compound heterozygotes. ATGL lipase function has been tested for missense mutations, reporting a residual activity ranging from 0% to 90%. The analysis of CGI58/ABHD5 revealed 4 different mutations in 5 NLSD-I patients. In one, with typical NLSD-I phenotype, no mutation was detected.

NLSDM fibroblasts have been used to test the efficiency of some drugs to reverse the phenotype by promoting TAG breakdown. WY-14643 significantly decreased the intracellular TAG content, while Salmeterol and Clenbuterol did not.

Molecular analyses showed a significant increase of muscle-specific miRNAs in NLSDM patients in comparison with healthy subjects, revealing an inverse correlation between muscle atrophy and the level of specific miRNAs. The dysregulation of miRNAs might represent an indicator of skeletal damage thus being useful to monitor NLSDM progression.

In ATGL-KO mice, we noted atrophy and functional alteration of soleus, EDL, tibialis anterior and diaphragm muscles. An up-regulation of pro-inflammatory cytokine IL-6 and IL-1b was also observed, suggesting that the ablation of ATGL promotes a sort of inflamm-aging, triggering muscle sarcopenia. Moreover, α -AChR expression was significantly increased in the muscle of ATGL-KO mice, a condition usually seen in a denervated muscle or under conditions altering the neuromuscular junction.

In summary, NLSD showed a wide heterogeneity of clinical manifestation and genetic background. Further investigations are needed to define mechanisms of muscle damage and develop therapeutic strategies.

Le malattie da accumulo di lipidi neutri (NLSD) sono un gruppo eterogeneo di disturbi genetici rari causati da mutazioni nel gene PNPLA2, che codifica per l'enzima ATGL, ed il suo attivatore, ABHD5/CGI-58. Le NLSD si suddividono in NLSD-M, principalmente con interessamento muscolare, e NLSD-I, con ittiosi. Queste malattie sono dovute ad un difetto del metabolismo dei lipidi, che porta ad

un accumulo generalizzato di grassi nel citoplasma di tutti i tipi di cellule dell'organismo.

Nel presente progetto, 17 pazienti con NLSM-M and 6 con NLSM-I sono stati diagnosticati in Italia e sono stati valutati clinicamente e geneticamente; i risultati delle analisi sono stati recentemente pubblicati (Ref 4).

I fibroblasti dei pazienti affetti da NLSM-M sono stati utilizzati per valutare l'efficacia di alcuni composti (WY-14643, salmeterolo, clenbuterolo) nell'attenuare l'accumulo di lipidi neutri. Il WY-14643 sembra determinare una diminuzione dei trigliceridi intracellulari, mentre il salmeterolo e il clenbuterolo non hanno manifestato alcun effetto. Nonostante siano state valutate varie concentrazioni e diversi tempi di trattamento, i dati sono da considerarsi ancora preliminari. Ad oggi, l'unico modello cellulare utilizzato sono i fibroblasti dei pazienti NLSM-M. Recentemente, alcuni pazienti hanno espresso il consenso al prelievo di biopsie muscolari dalle quali sono stati messi in coltura mioblasti; questi potranno essere utilizzati per confermare l'effetto lipolitico di WY-14643 ed eventualmente per testare nuovi composti.

Parte del progetto, è stata dedicata alla scoperta di molecole che indicano la presenza e l'avanzamento della malattia nell'uomo. Dati clinici e molecolari hanno evidenziato un aumento significativo di alcune piccole molecole di RNA (dette miRNA) nel plasma dei pazienti rispetto ai soggetti di controllo. Inoltre si è osservata una correlazione inversa tra l'atrofia muscolare ed il livello di specifici miRNA. Queste piccole molecole di RNA potrebbero fornire una indicazione del danno muscolare ed essere utili nel monitorare la progressione della malattia.

Un contributo importante è stato fornito dal modello animale di NLSM-M, rappresentato da un topo in cui l'espressione di ATGL è del tutto assente. In questo modello, si è osservata atrofia e alterazioni funzionali di vari muscoli (soleus, tibiale anteriore e il muscolo del diaframma). Inoltre è stata osservata una maggiore espressione di alcune citochine pro-infiammatorie, suggerendo che la mancanza di ATGL possa promuovere un processo scatenante l'atrofia muscolare. Queste ultime osservazioni, causate dalla reazione del sistema immunitario in assenza totale o parziale di ATGL, verranno prossimamente verificate nei pazienti affetti da NLSM-M.

In sintesi, le malattie da accumulo di lipidi neutri presentano una grande eterogeneità genetica e una vasta gamma di manifestazioni cliniche. Ulteriori sforzi devono essere impiegati per sviluppare appropriate strategie terapeutiche.

1. Tavian D, Maggi L, Mora M, Morandi L, Bragato C, Missaglia S. (2019) A novel PNPLA2 mutation causing total loss of RNA and protein expression in two NLSM siblings with early onset but slowly progressive severe myopathy. *Genes & Diseases*, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.006>.
2. Missaglia S, Coleman RA, Mordente A, Tavian D. (2019) Neutral Lipid Storage Diseases as Cellular Model to Study Lipid Droplet Function. *Cells*. pii: E187.
3. Angelini C, Pennisi E, Missaglia S, Tavian D. (2019) Metabolic lipid muscle disorders: biomarkers and treatment. *Ther Adv Neurol Disord*. 12:1756286419843359.
4. Pennisi EM, Arca M, Bertini E, Bruno C, Cassandrini D, D'amico A, Garibaldi M, Gragnani F, Maggi L, Massa R, Missaglia S, Morandi L, Musumeci O, Pegoraro E, Rastelli E, Santorelli FM, Tasca E, Tavian D, Toscano A, Angelini C; Italian NLSM Group. (2017) Neutral Lipid Storage Diseases: clinical/genetic features and natural history in a large cohort of Italian patients. *Orphanet J Rare Dis*. 12:90.
5. Tavian D, Missaglia S, Castagnetta M, Degiorgio D, Pennisi EM, Coleman RA, Dell'Era P, Mora C, Angelini C, Coviello DA. (2017) Generation of induced Pluripotent Stem Cells as disease modelling of NLSM. *Mol Genet Metab*. 121:28-34.
6. Missaglia S, Maggi L, Mora M, Gibertini S, Blasevich F, Agostoni P, Moro L, Cassandrini D, Santorelli FM, Gerevini S, Tavian D. (2017) Late onset of neutral lipid storage disease due to novel PNPLA2 mutations causing total loss of lipase activity in a patient with myopathy and slight cardiac

involvement. *Neuromuscul Disord.* 27:481-486.

7. Pasanisi MB, Missaglia S, Cassandrini D, Salerno F, Farina S, Andreini D, Agostoni P, Morandi L, Mora M, Tavian D. (2016) Severe cardiomyopathy in a young patient with complete deficiency of adipose triglyceride lipase due to a novel mutation in PNPLA2 gene. *Int J Cardiol*, 207:165-167.

8. Angelini C, Nascimbeni AC, Cenacchi G, Tasca E. (2016) Lipolysis and lipophagy in lipid storage myopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1862:1367-1373.

9. Missaglia S, Tasca E, Angelini C, Moro L, Tavian D. (2015) Novel missense mutations in PNPLA2 causing late onset and clinical heterogeneity of neutral lipid storage disease with myopathy in three siblings. *Mol Genet Metab*, 115:110-117.

10. Pennisi EM, Missaglia S, Di Mauro S, Bernardi C, Akman HO, Tavian D. (2015) A myopathy with unusual features caused by PNPLA2 gene mutations. *Muscle Nerve*, 51:609-613.

Malattia da accumulo di lipidi neutri

Coordinator: Marcello Arca

Partners: Daniela Tavian, Corrado Angelini, Elena Maria Pennisi, Antonio Musarò

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

Telethon Project (nr):

GGP14066

Disease Name:

Neutral Lipid Storage Disease

Keywords:

Neutral lipid metabolism, Myopathy Cardiomyopathy Hepatomegaly Ichthyosis, ATGL/ABHD5