

Poster P.07.43

CLINICAL, GENETIC AND FUNCTIONAL STUDIES ON JOUBERT SYNDROME AND RELATED DISORDERS: A MODEL TO UNDERSTAND THE COMPLEXITY OF CILIOPATHIES

Valente E.M.^[2], Consalez G.^[3], Filippo C.^[3], Croci L.^[3], Micalizzi A.^[4], Nuovo S.^[5], Ginevrino M.^[5], Romani M.^[6], Zanni G.^[1], **Bertini E.**^{*(1)}

^[1]Laboratorio di Medicina Molecolare, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma ~ Rome ~ Italy, ^[2]Dept. of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, 27100, Italy; ~ Pavia ~ Italy, ^[3]2Divisione di Neuroscienze, IRCCS San Raffaele, Milano ~ Milano ~ Italy, ^[4]Unita' di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma ~ Rome ~ Israel, ^[5]Neurogenetics Unit, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome, 00143, Italy ~ Rome ~ Italy, ^[6]Molecular Genetics Laboratory, GENOMA Group, Rome, 00138, Italy ~ Rome ~ Italy

Background: Joubert syndrome (JS, MIM213300) is a congenital ataxia characterized by a complex midbrain-hindbrain malformation (the molar tooth sign). The neurological features of JS are often complicated by multiorgan involvement, mainly of the retina, kidneys and liver. To date, 26 causative genes have been identified, all encoding proteins of the primary cilium. This is a nearly ubiquitous organelle that plays major roles in embryonic development and in functioning of many cell types.

The project generated the following results:

- 556 JS families have been recruited and characterized regarding clinical and neuroimaging data. To estimate the prevalence in Italy of JS we identified 284 JS patients: the overall, female- and male-specific prevalence rates were 0.47 (95% CI 0.41-0.53), 0.41 (95% CI 0.32-0.49) and 0.53 (95% CI 0.45-0.61) per 100,000 population, respectively.
- 314 patients underwent NGS-based target sequencing of 120 ciliary genes. Biallelic mutations have been identified in 189 patients (60%). Genes most commonly mutated are: CEP290 (9%), C5orf42 (8%), AH11 (7%), CC2D2A (7%) and TMEM67 (6%). In further 44 patients we could identify a single heterozygous mutation, and these patients will undergo high resolution custom array-CGH to identify possible exonic deletions or multiplications.
- 3 novel genes causative of JS (CEP120 e TMEM17, SUFU) have been identified through whole exome sequencing, and their phenotypic spectrum has been characterized.

The Zfp423/ZNF423 gene encodes a 30-zinc-finger transcription factor involved in key developmental pathways. ZNF423 mutations have been identified in individuals affected by Joubert Syndrome. Although Zfp423-null mice feature cerebellar malformations, many of the underlying developmental defects have been poorly characterized. To study in vivo the function of ZFP423 in central nervous system development, we analyzed allelic murine mutants in which distinct functional protein domains are deleted. Our results indicate that: 1) different ZFP423 protein domains are required for the maintenance of the Purkinje cell (PC) progenitor pool and for PC progenitor differentiation; 2) in Zfp423 mutants, cell cycle progression is remarkably delayed and DNA damage response markers are upregulated in the cerebellar ventricular zone; 3) Zfp423 mutants display a marked reduction of the fourth ventricle choroid plexus (ChP), revealing a near-complete lack of multiciliated ChP ependymal cells. 4) Differentiation and survival of cerebellar glutamatergic progenitors are impaired in Zfp423 mutants, giving rise to malformed cerebellar nuclei and altered routing of their efferent tracts.

La sindrome di Joubert (SJ, MIM213300) è un'atassia congenita caratterizzata da una malformazione cerebellare e del troncoencefalo ("segno del dente molare"). Le caratteristiche neurologiche della SJ sono spesso complicate dal coinvolgimento di diversi organi, principalmente retina, reni e fegato. Ad oggi, sono stati identificati oltre 30 geni causativi, tutti codificanti per proteine del cilio primario. Questo

è un organello quasi ubiquitario che svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale e nel funzionamento di molti tipi cellulari.

Il progetto ha generato i seguenti risultati:

- sono state reclutate 556 famiglie SJ, per le quali sono disponibili dettagliati dati clinici e di neuroimaging. In 54 pazienti italiani, l'utilizzo di una batteria neuropsicologica completa ha consentito di definire il profilo cognitivo e comportamentale, evidenziando i domini più comunemente compromessi. E' inoltre in corso uno studio sulla qualità della vita dei pazienti SJ adulti, mediante somministrazione di apposite scale valutative.
- 314 pazienti sono stati sottoposti a sequenziamento NGS di 120 geni ciliari. Mutazioni bialleliche sono state identificate in 189 pazienti (60%). I geni più frequentemente mutati sono risultati: CEP290 (9%), C5orf42 (8%), AHI1 (7%), CC2D2A (7%) e TMEM67 (6%). In ulteriori 44 pazienti è stata identificata una singola mutazione patogenetica in eterozigosi, e tali pazienti saranno sottoposti ad indagine CGH-array ad alta definizione per evidenziare eventuali delezioni o duplicazioni esoniche.
- sono stati identificati mediante WES due nuovi geni causativi di sindrome di Joubert (CEP120 e TMEM17), di cui è stato caratterizzato lo spettro fenotipico.
- ZNF423, un gene implicato nella JS ed in altri fenotipi ciliari, è stato caratterizzato in due linee murine mutanti, ciascuna delle quali presenta una distinta delezione parziale del gene murino, Zfp423, con perdita di domini proteici distinti. I nostri risultati indicano chiaramente che Zfp423 controlla la neurogenesi delle cellule di Purkinje (PC). Entrambe le mutazioni alleliche rallentano la proliferazione dei progenitori neuronali GABAergici al picco della neurogenesi delle PC, causando uno stallo nella transizione tra le fasi G2 ed M del ciclo. Ciascuna mutazione provoca invece un effetto distinto sull'uscita del ciclo, sul differenziamento e sulla organizzazione della corteccia cerebellare. Il numero totale di PC mature è molto ridotto in entrambi i mutanti, con un effetto particolarmente marcato a livello del verme. Un'analisi RNA-seq condotta a stadi precoci dello sviluppo cerebellare rivela che le mutazioni di Zfp423 producono alterazioni in vie di segnale fondamentali per il patterning del primordio cerebellare. Infine, abbiamo intrapreso l'analisi di un mutante condizionale per valutare i contributi relativi di componenti cellulari neurogeniche ed extraneurali (in particolare la roof plate) all'insorgenza delle malformazioni osservate nei mutanti Zfp423.

1: Altieri F, D'Anzi A, Martello F, Tardivo S, Spasari I, Ferrari D, Bernardini L, Lamorte G, Mazzoccoli G, Valente EM, Vescovi AL, Rosati J. Production and characterization of human induced pluripotent stem cells (iPSC) CSSi007-A (4383) from Joubert Syndrome. *Stem Cell Res.* 2019 Jul;38:101480.

2: Nuovo S, Fuiano L, Micalizzi A, Battini R, Bertini E, Borgatti R, Caridi G, D'Arrigo S, Fazzi E, Fischetto R, Ghiggeri GM, Giordano L, Leuzzi V, Romaniello R, Signorini S, Stringini G, Zanni G, Romani M, Valente EM, Emma F. Impaired urinary concentration ability is a sensitive predictor of renal disease progression in Joubert syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2018 Nov 6.

3: Toma C, Ruberto G, Marzi F, Vandelli G, Signorini S, Valente EM, Antonini M, Bertone C, Bianchi PE. Macular staphyloma in patients affected by Joubert syndrome with retinal dystrophy: a new finding detected by SD-OCT. *Doc Ophthalmol.* 2018 Aug;137(1):25-36.

4: Bonnard C, Shboul M, Tonekaboni SH, Ng AYJ, Tohari S, Ghosh K, Lai A, Lim JY, Tan EC, Devisme L, Stichelbout M, Alkindi A, Banu N, Yüksel Z, Ghoumid J, Elkhartoufi N, Boutaud L, Micalizzi A, Brett MS, Venkatesh B, Valente EM, Attié-Bitach T, Reversade B, Kariminejad A. Novel mutations in the ciliopathy-associated gene CPLANE1 (C5orf42) cause OFD syndrome type VI rather than Joubert syndrome. *Eur J Med Genet.* 2018 Oct;61(10):585-595.

5: Rosati J, Altieri F, Tardivo S, Turco EM, Goldoni M, Spasari I, Ferrari D, Bernardini L, Lamorte G, Valente EM, Vescovi AL. Production and characterization of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from Joubert Syndrome: CSSi001-A (2850). *Stem Cell Res.* 2018 Mar;27:74-77.

6: De Mori R, Romani M, D'Arrigo S, Zaki MS, Loreface E, Tardivo S, Biagini T, Stanley V, Musaev D, Fluss J, Micalizzi A, Nuovo S, Illi B, Chiapparini L, Di Marcotullio L, Issa MY, Anello D, Casella A,

Ginevrino M, Leggins AS, Roosing S, Alfonsi R, Rosati J, Schot R, Mancini GMS, Bertini E, Dobyns WB, Mazza T, Gleeson JG, Valente EM. Hypomorphic Recessive Variants in SUFU Impair the Sonic Hedgehog Pathway and Cause Joubert Syndrome with Cranio-facial and Skeletal Defects. *Am J Hum Genet.* 2017 Oct 5;101(4):552-563.

Sindrome di Joubert

Coordinator: Enrico Bertini

Partners: Giangiacomo Consalez, Enza Maria Valente

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

Telethon Project (nr):

GGP13146

Disease Name:

Joubert Syndrome

Keywords:

Genetics, Joubert syndrome, Congenital Ataxia