

## Poster P.11.89

### EXPLOITING TARGETED EPIGENOME EDITING FOR THERAPEUTIC APPLICATIONS AND TO UNCOVER NOVEL GENE REPRESSION MECHANISMS.

Migliara A.<sup>[1]</sup>, Del Borrello R.<sup>[1]</sup>, Cappelluti M.A.<sup>[2]</sup>, Caserta I.<sup>[2]</sup>, Baccega T.<sup>[2]</sup>, Reschigna A.<sup>[2]</sup>, Capasso P.<sup>[2]</sup>, Lombardo A.\*<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute, and Vita-Salute San Raffaele University ~ Milan ~ Italy

Our Group is interested in developing innovative approaches to treat diseases and to study fundamental biological questions. To this end, we have recently developed a novel modality of gene silencing that exploits epigenetics to convey inheritable states of transcriptional repression at desired target genes of somatic cells (Amabile et al., Cell 2016). This strategy is based on transient delivery of combinations of Engineered Transcriptional Repressors (ETRs), chimeric proteins containing a programmable RNA-guided DNA binding domain based on the CRISPR/Cas9 system and epigenetic effector domains from an embryonically restricted repressive complex. Once co-delivered into the cell, the ETRs bind to and synergize at regulatory elements of the target gene to promote de novo deposition of DNA methylation, thus permanently silencing gene expression. The hit-and-run nature of this platform coupled with the long-term stability of the induced epigenetic modifications makes it an attractive alternative to conventional gene silencing approaches. Further advantages of our epigenetic silencing platform include: (1) it does not induce potentially genotoxic DNA double stranded breaks, as opposed to gene editing approaches based on artificial nucleases; (2) it can be reverted either by targeted DNA demethylation or by administration of clinically approved DNA demethylating agents. We are currently exploiting this innovative strategy to: (i) tackle inherited diseases for which gene silencing is a valid therapeutic solution, such as hemoglobinopathies and familial hypercholesterolemia (project TGT16F05); (ii) determine the specificity and persistence of epigenetic silencing across cell development and differentiation, two key aspects for effective and safe exploitation of the technology; (iii) shed light into the fundamental principles governing establishment and maintenance of epigenetic silencing (project TGT16F01), basic biological information that can potentially be used to further improve the platform. To accomplish these goals, we are taking advantage of stealth and effective gene delivery procedures, relevant disease models, genome-scale loss-of-function and single-cell transcriptomic analyses.

**Titolo:** Sviluppo di una piattaforma per il silenziamento genico mirato e suo utilizzo per identificare nuovi meccanismi di repressione genica.

**Abstract:** Il nostro gruppo di ricerca si occupa di sviluppare approcci innovativi per il trattamento di malattie genetiche e per dare risposta a questioni biologiche fondamentali. A questo scopo, abbiamo recentemente sviluppato una nuova strategia di silenziamento genico che, sfruttando meccanismi epigenetici, induce stati di repressione trascrizionale ereditabili sui geni di interesse in cellule somatiche (Amabile et al., Cell 2016). Questo sistema è basato sull'espressione transiente di diverse combinazioni di Repressori Trascrizionali Ingegnerizzati (RTI), proteine chimeriche che contengono un dominio di legame al DNA programmabile, come il sistema CRISPR-Cas9, e domini effettori derivati da un complesso repressivo epigenetico attivo durante l'embriogenesi. Una volta veicolati nella cellula, gli RTI si legano a elementi regolatori del gene bersaglio e, attraverso la deposizione de novo di metilazione del DNA, ne inducono il silenziamento permanente. La natura "hit-and-run" di questa piattaforma associata alla capacità di determinare modifiche epigenetiche stabili nel tempo la rendono

una promettente alternativa ai tradizionali approcci di silenziamento genico. Questa tecnologia offre ulteriori vantaggi: (1) non comporta distruzione del DNA e conseguente rischio di genotossicità, a differenza delle strategie di gene editing basate sull'uso di nucleasi artificiali; (2) è possibile revertire lo stato di metilazione indotto dagli RTI mediante demetilazione mirata del DNA bersaglio o somministrando agenti demetilanti clinicamente approvati. Nel nostro laboratorio questa strategia innovativa viene utilizzata: (i) come approccio di silenziamento genico mirato, possibile soluzione terapeutica in patologie ereditarie quali le emoglobinopatie e l'ipercolesterolemia familiare (progetto TGT16F05); (ii) per studiare la specificità e la stabilità del silenziamento epigenetico durante lo sviluppo cellulare e il differenziamento, due aspetti chiave per l'utilizzo efficace e sicuro della tecnologia; (iii) per chiarire principi fondamentali alla base dell'induzione e del mantenimento del silenziamento epigenetico (progetto TGT16F01), principi che potrebbero fornire informazioni biologiche per l'ottimizzazione della strategia stessa. Per conseguire tali scopi, ci avvaliamo di procedure di trasferimento genico mirato, modelli rilevanti di malattie, approcci di loss-of-function sul genoma e analisi del trascrittoma a singola cellula.

Amabile et al., Cell 2016

Ipercolesterolemia familiare, Emoglobinopatie

Coordinator: Angelo Lombardo

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16F01; TGT16F05

**Disease Name:**

Familial Hypercholesterolemia, Hemoglobinopathies

**Keywords:**

Targeted gene silencing, familial hypercholesterolemia, gene discovery