

## Poster P.21.143

### UNRAVELLING THE ROLE OF PAX2 MUTATIONS IN HUMAN FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS

Trionfini P.\*, Longaretti L., Ciampi O., Tomasoni S., Benigni A.

*Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS ~ Bergamo ~ Italy*

Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) is the typical renal histologic lesion found in familial steroid-resistant nephrotic syndrome, for which there is currently no treatment. Dysfunction of the glomerular podocyte, a specialized cell that forms the glomerular filtration barrier, is central to the pathogenesis of FSGS. So far, several mutations in genes encoding proteins expressed in the podocyte have been identified. A new disease segregating missense heterozygous mutation (c.565G>A, p.G189R) in the PAX2 gene was recently identified in a family with adult onset autosomal dominant FSGS. Mutations in PAX2 were already associated with rare congenital abnormalities of the kidney and urinary tract and renal coloboma syndrome, but little is known about the effects of PAX2 mutations on the development of diseases affecting the glomerular components of the kidney.

In the ongoing Telethon project (GGP17221), we generated patient-specific induced pluripotent stem cells (PAX2<sup>G189R/+</sup> iPSCs) (1) that have been differentiated into podocytes using a protocol we recently developed (2). Podocytes have been characterized for their phenotype and function in comparison to healthy control iPSC-derived podocytes. Patient podocytes exhibited a phenotype similar to that of control podocytes. The expression of podocyte genes was comparable to that of control podocytes, with small differences at the RNA levels that, however, did not translate into a significantly different pattern of expression at the protein level. Since podocytes are crucial to maintaining the structural integrity of the glomerular filtration barrier, which is a highly dynamic structure regulated through the motility of podocyte foot processes, we evaluated the cell motility of podocytes derived from healthy and PAX2<sup>G189R/+</sup> iPSCs using the scratch wound healing assay. We observed that mutation significantly affected podocyte motility, compared with podocytes derived from control iPSCs. To assess whether the PAX2 mutation could be responsible for this abnormality, we fixed the point mutation in patient iPSCs by the means of CRISPR-Cas9-based homology-dependent repair. Particularly, we successfully corrected the c.565G>A point mutation through a HDR-based method combining a rational design of sgRNAs and single-stranded DNA oligonucleotide (ssODN) with the small molecule L755507 that has been shown to enhance short nucleotide polymorphisms (SNP) editing in iPSCs. We observed that gene editing rescued motility of edited iPSCs-derived podocytes that migrated similarly to control podocytes (3).

In conclusion, we have generated an in vitro disease model that has allowed us to identify altered podocyte motility that could be the initial event that leads to the loss of podocytes and development of proteinuria, with a progressive decline in renal function. This in vitro model provides significant technical advances in studying genetic abnormalities associated to FSGS.

#### COMPRENDERE IL RUOLO DELLE ALTERAZIONI DEL GENE DI PAX2 NELLO SVILUPPO DI GLOMERULOSCLEROSI FOCALE SEGMENTARIA

La glomerulosclerosi focale segmentaria (GFS) è una lesione del rene che colpisce i podociti, cellule specializzate responsabili della capacità del rene di eliminare nelle urine molecole tossiche e di trattenere nel sangue sostanze utili come l'albumina. In pazienti con GFS il filtro renale non funziona e ciò causa una perdita di proteine nelle urine e porta a insufficienza renale terminale. Non esiste una terapia specifica per questa malattia. Studi nelle forme familiari hanno identificato difetti genetici che

alterano proteine implicate nello sviluppo e nella struttura del podocita. Recentemente in due pazienti della stessa famiglia affetti da GFS con esordio in età adulta, è stata identificata una nuova alterazione nel gene che codifica per PAX2, proteina chiave nello sviluppo del rene. Poco si conosce sugli effetti che questa alterazione può avere sulla maturazione e la funzione del podocita.

Nel progetto Telethon in corso (GGP17221), abbiamo trasformato cellule adulte del sangue del paziente con alterazione nel gene che codifica per PAX2 in cellule simil-embrionali chiamate cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) capaci di differenziarsi in qualsiasi cellula del nostro corpo. Le iPSC sono state quindi indirizzate a diventare podociti grazie ad un protocollo che abbiamo generato recentemente nei nostri laboratori. Abbiamo così potuto studiare la struttura e la funzione di tali podociti confrontandoli con podociti ottenuti da cellule di un soggetto sano di controllo. I podociti del paziente mostravano una morfologia analoga ai podociti di controllo e una simile espressione di marcatori tipici di queste cellule. Una delle caratteristiche dei podociti è quella di essere cellule mobili dotate di una capacità migratoria. Abbiamo quindi valutato se i podociti del paziente fossero in grado di muoversi come i podociti di controllo e abbiamo riscontrato una ridotta mobilità delle cellule del paziente. Per capire se la mutazione potesse rendere ragione di questa alterazione, abbiamo corretto la mutazione nel gene PAX2 nelle cellule iPSC del paziente utilizzando la tecnica di correzione genica CRISPR-Cas9. Dopo aver differenziato le cellule iPSC corrette in podociti, abbiamo valutato nuovamente la capacità migratoria e abbiamo visto che la correzione aveva effettivamente consentito di ripristinare una corretta motilità delle cellule.

In questo studio abbiamo generato un modello in vitro di malattia che ci ha permesso di identificare un'alterata motilità del podocita che potrebbe essere l'evento iniziale che porta alla perdita dei podociti stessi e quindi alla progressiva riduzione di funzionalità renale. Stiamo ora conducendo studi per identificare nuovi composti in grado di normalizzare il comportamento dei podociti.

- 1) Benedetti V et al., EBioMedicine; 33:253 (2018).
- 2) Ciampi O. et al., Stem Cell Res; 17:130 (2016).
- 3) Trionfini P. et al., The CRISPR Journal, 2:108 (2019).

Glomerulosclerosi Focale Segmentaria

Coordinator: Ariela Benigni

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17221

**Disease Name:**

Focal Segmental Glomerulosclerosis

**Keywords:**

Induced Pluripotent Stem Cells, PAX2, CRISPR-Cas9