

# 01\_Genetic muscular disease\Muscular dystrophies

## Poster P.01.1

### A NATION-WIDE ITALIAN REGISTRY FOR PATIENTS WITH MUSCULAR DYSTROPHIES AND MYOPATHIES

D'Amico A.<sup>[1]</sup>, Comi G.<sup>[3]</sup>, Tupler R.<sup>[4]</sup>, Bruno C.\*<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>BAMBINO GESU' HOSPITAL ~ ROMA ~ Italy, <sup>[2]</sup>G.GASLINI INSTITUTE ~ GEONVA ~ Italy, <sup>[3]</sup>Fondazione I.R.C.C.S. Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico ~ MILANO ~ Italy, <sup>[4]</sup>Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia ~ MODENA ~ Italy

Muscular dystrophies and myopathies represent heterogeneous group of rare conditions, with different clinical and molecular features.

In light of the extraordinary progress in understanding on the pathogenesis and the molecular bases and to the incoming therapeutic approaches for several muscle disorders, patient registries are becoming essential.

We propose to build-up a registry on Muscular dystrophies and myopathies that will be part of the Telethon Italian NMD registry. This registry will be developed on a IT platform which has a user-friendly web interface allowing both direct patients' and clinicians' participation. The registry will be focused on Congenital Muscular Dystrophies (CMDs), Congenital Myopathies (CMs), Limb girdle muscular dystrophies (LGMDs) and Facioscapulohomeral dystrophy (FSHD), and will involve the 4 clinical networks centers already established for these diseases through previously funded Telethon projects. All the researchers involved have gained expertise working on specific projects. This registry, by guaranteeing the collection of accurate clinical data according to the best clinical practices, will be useful to i) provide epidemiological data, ii) better describe natural history, iii) obtain a better genotype-phenotype characterization, iv) identify new phenotypes, and v) improve management of specific disorders

We believe that this registry may facilitate feasibility studies, trial design and rapid identification of the most suitable patients to be included in clinical trials.

Le distrofie muscolari e le miopatie congenite rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie rare che si presentano con caratteristiche cliniche e molecolari differenti. Alla luce degli enormi progressi compiuti nella comprensione della patogenesi e delle basi molecolari di queste patologie e in vista degli approcci terapeutici emergenti per molte di queste patologie, riteniamo che la costituzione di registri di malattia sia molto importante.

Con questo progetto proponiamo la costituzione di un registro di Distrofie muscolari e Miopatie che sia integrato nel registro Telethon Italiano sulle malattie neuromuscolari [vedi [www.registronmd.it](http://www.registronmd.it)].

Questo registro sarà sviluppato su una piattaforma elettronica di semplice utilità con un interfaccia che permetta la partecipazione e l'inserimento di dati da parte dei pazienti e dei ricercatori.

Il registro sarà sviluppato su Distrofie Muscolari Congenite (CMDs), Miopatie Congenite (CMs), Distrofie Muscolari dei Cingoli (LGMDs) e sulla distrofia Facio ScapoloOmerale (FSHD e coinvolgerà le 4 reti cliniche che, grazie al supporto del Telethon, si sono costituite negli ultimi anni.

Tutti i ricercatori coinvolti nei network hanno acquisito una importante esperienza su queste patologie, lavorando su specifici progetti di ricerca.

Questo registro, garantendo la raccolta accurata di dati, conforme alle linee guida di buona pratica clinica sarà molto utile per: i) fornire dati epidemiologici su queste patologie, ii) descrivere in modo accurato la storia naturale, iii) definire meglio le correlazioni genotipo-fenotipo, iv) identificare nuovi fenotipi clinici e v) migliorare la gestione clinica delle diverse forme di patologia, Riteniamo che questi

obiettivi sono la base per favorire lo sviluppo di studi clinici, contribuire al disegno di trials clinici e identificare al meglio pazienti idonei alla partecipazione a questi studi.

1. Bönnemann CG, et al. Members of International Standard of Care Committee for Congenital Muscular Dystrophies. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *NeuromusculDisord* 2014;24(4):289-311.
2. Jungbluth H, et al. Congenital myopathies: disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. *Nat Rev Neurol* 2018;14(3):151-167.
3. Liewluck T, Milone M. Untangling the complexity of limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2018;58(2):167-177.
4. Tawil R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *HandbClin Neurol*. 2018;148:541-548.
5. Biancheri R, et al. POMGnT1 mutations in congenital muscular dystrophy: genotype-phenotype correlation and expanded clinical spectrum. *Arch Neurol* 2006;63(10):1491-5.
6. D'Amico A, et al. Expanding the clinical spectrum of POMT1 phenotype. *Neurology*. 2006 May 23;66(10):1564-7; discussion 1461.
7. Mercuri E, et al. POMT2 mutation in a patient with 'MEB-like' phenotype. *NeuromusculDisord* 2006;16(7):446-8.
8. D'Amico A, et al. Heart transplantation in a child with LGMD2I presenting as isolated dilated cardiomyopathy. *NeuromusculDisord* 2008;18(2):153-5.
9. Messina S, et al. POMT1 and POMT2 mutations in CMD patients: a multicentric Italian study. *NeuromusculDisord* 2008;18(7):565-71.
10. Mercuri E, et al. Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan: a population study. *Neurology* 2009;72(21):1802-9.
11. Messina S, et al. Congenital muscular dystrophy with defective alpha-dystroglycan, cerebellar hypoplasia, and epilepsy. *Neurology* 2009;73(19):1599-601.
12. Messina S, et al. Congenital muscular dystrophies with cognitive impairment. A population study. *Neurology* 2010;75(10):898-903.
13. Pane M, et al. Respiratory and cardiac function in congenital muscular dystrophies with alpha dystroglycan deficiency. *Neuromuscul Disord* 2012;22(8):685-9.
14. Graziano A, et al. Prevalence of congenital muscular dystrophy in Italy: a population study. *Neurology* 2015;84(9):904-11.
15. Astrea G, et al. TMEM5-associated dystroglycanopathy presenting with CMD and mild limb-girdle muscle involvement. *Neuromuscul Disord*. 2016 Jul;26(7):459-61.
16. D'Amico A, et al. A new de novo missense mutation in MYH2 expands clinical and genetic findings in hereditary myosin myopathies. *Neuromuscul Disord* 2013;23(5):437-40.
17. Catteruccia M, et al. Centronuclear myopathy related to dynamin 2 mutations: clinical, morphological, muscle imaging and genetic features of an Italian cohort. *Neuromuscul Disord* 2013;23(3):229-38.
18. Hedberg C, et al. Childhood onset tubular aggregate myopathy associated with de novo STIM1 mutations. *J Neurol* 2014;261(5):870-6.
19. Castiglioni C, et al. Musclemagnetic resonance imaging and histopathology in ACTA1-related congenital nemaline myopathy. *Muscle Nerve* 2014;50(6):1011-6.
20. Fattori F, et al. Centronuclear myopathies: genotype-phenotype correlation and frequency of defined genetic forms in an Italian cohort. *J Neurol* 2015;262(7):1728-40.
21. Tasca G, et al. Muscle imaging in patients with tubular aggregate myopathy caused by mutations in STIM1. *Neuromuscul Disord* 2015;25(11):898-903.
22. Fiorillo C, et al. Italian Network on Congenital Myopathies. MYH7-related myopathies: clinical,

histopathological and imaging findings in a cohort of Italian patients. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11(1):91.

23. Savarese M, et al. The genetic basis of undiagnosed muscular dystrophies and myopathies: Results from 504 patients. *Neurology* 2016;87(1):71-6.

24. Cassandrini D, et al. Italian Network on Congenital Myopathies. Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools. *Ital JPediatr* 2017;43(1):101.

25. Fattori F, et al. Expanding the histopathological spectrum of CFL2-related myopathies. *Clin Genet* 2018;93(6):1234-1239.

26. Tasca G, et al. MRI in sarcoglycanopathies: a large international cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89(1):72-77.

27. Cagliani R, et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscul Disord* 2003;13(10):788-95.

28. Piluso G, et al. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J Med Genet* 2005;42(9):686-93.

29. Cagliani R, et al. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. *Hum Mutat* 2005;26(3):283.

30. Guglieri M, et al. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta* 2005;361(1-2):54-79.

31. Magri F, et al. Frequency and characterisation of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord* 2012;22(11):934-43.

32. Magri F, et al. Revised Genetic Classification of Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Curr Mol Med* 2014;14(8):934-943.

33. Magri F, et al. . ISPD mutations account for a small proportion of Italian Limb Girdle Muscular Dystrophy cases. *BMC Neurol* 2015;15:172.

34. Magri F, et al. The italian limb girdle muscular dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis. *Muscle Nerve* 2017;55(1):55-68.

35. Brusa R, et al. A new case of limb girdle muscular dystrophy 2G in a Greek patient, founder effect and review of the literature. *Neuromuscul Disord* 2018;28(6):532-537.

36. Perini G, et al. Profound misregulation of muscle-specific gene expression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12650-12654, 1999.

37. Gabellini D., Green M.R., Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: A repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell*, 110,339-348, 2002.

38. Sposito R, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy type 1A in northwestern Tuscany: a molecular genetics-based epidemiological and genotype-phenotype study. *Genet Test* 2005;9(1):30-6.

39. Gabellini D, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1. *Nature* 2006;439(7079):973-7.

40. Trevisan CP, et al. A. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: a multicenter study on hearing function. *Audiol Neurootol* 2008;13(1):1-6.

41. Lamperti C, et al. . A standardized clinical evaluation of patients affected by facioscapulohumeral muscular dystrophy: The FSHD clinical score. *Muscle Nerve* 2010;42(2):213-7.

42. Scionti I, et al. Large-scale population analysis challenges the current criteria for the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2012;90(4):628-35.

43. Ricci G, et al. Rippling muscle disease and facioscapulohumeral dystrophy-like phenotype in a patient carrying a heterozygous CAV3 T78M mutation and a D4Z4 partial deletion: Further evidence for "double trouble" overlapping syndromes. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(6):534-40.

44. Scionti I, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: new insights from compound heterozygotes and implication for prenatal genetic counselling. *J Med Genet* 2012;49(3):171-8.
45. Ricci G, et al. Large scale genotype-phenotype analyses indicate that novel prognostic tools are required for families with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Brain*. 2013;136
46. Ricci G, Zatz M, Tupler R. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: More Complex than it Appears. *Curr Mol Med* 2014;14(8):1052-1068.
47. Pasotti S, et al. An integrated approach in a case of facioscapulohumeral dystrophy. *BMC Musculoskelet Disord* 2014;15:155.
48. Sancisi V, et al. Altered Tnnt3 characterizes selective weakness of fast fibers in mice overexpressing FSHD region gene 1 (FRG1). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;306(2):R124-37.12
49. Ricci et al. A novel clinical tool to classify facioscapulohumeral muscular dystrophy phenotypes. *J Neurol* 2016;263(6):1204-14.
50. Nikolic A et al. Clinical expression of facioscapulohumeral muscular dystrophy in carriers of 1-3 D4Z4 reduced alleles: experience of the FSHD Italian National Registry. *BMJ Open* 2016;6(1):e007798.
51. Goselink RJM, et al. Early onset facioscapulohumeral dystrophy - a systematic review using individual patient data. *Neuromuscul Disord* 2017;27(12):1077-1083.

Distrofie Muscolari e Miopatie

Coordinator: Adele D'Amico

Partners: Claudio Bruno, Giacomo Comi, Rossella Tupler

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2019-2020

**Telethon Project (nr):**

GSP18002

**Disease Name:**

CMD, LGMD, FSHD, CM

**Keywords:**

congenital muscular dystrophies, limb girdle muscular dystrophies, FSHD

## Poster P.01.2

### UPDATE ON THE BON-DMD (GUP11011) STUDY: THE BIOCHEMICAL MARKERS

**Broggi F.**<sup>[1]</sup>, Vai S.<sup>[2]</sup>, Bianchi M.L.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Laboratorio Analisi Cliniche, Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche, Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Laboratorio Sperimentale di Ricerche sul Metabolismo Osseo Infantile, Unità Metabolismo Osseo, Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Milano ~ Milano ~ Italy

Low bone mineral density (BMD) and increased risk of fractures, vertebral and appendicular, have been observed in Duchenne Muscular Dystrophy [1-8]. Bone metabolism in this disease is still poorly known, and it is unclear: (1) whether bone alterations are independent of glucocorticoids (GCs) and reduced mobility; (2) which patients have a higher risk of bone mass loss and fractures; (3) which changes in bone metabolism, bone turnover, and BMD can be attributed to GCs.

To answer such questions, the project BON-DMD (GUP11011) was started as an ancillary project to FOR-DMD, an international multicenter study involving 40 centers in 5 countries. FOR-DMD is aimed to evaluate the efficacy and safety of 3 different therapeutic GC regimens, in over 200 children affected by DMD, prepubertal (4-7 y), ambulant, not yet on GCs, treated with adequate vitamin D supplementation, and randomized into one of the 3 GCs regimens. BON-DMD study is aimed at studying bone metabolism and turnover (with standard laboratory tests), fractures, and BMD changes (with DXA) over 36 months. The following tests were performed: (a) on serum: parathyroid hormone (PTH), 25-OH vitamin D (25-OH D), osteocalcin (OC), bone alkaline phosphatase (BSAP), C-terminal telopeptide of type I collagen (CTx), receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), interleukin 6 (IL-6); (b) on urine: N-terminal telopeptide of type I collagen (NTx).

We are presenting the preliminary results on a subgroup of 45 DMD children (mean age at enrolment 5.0±0.8 y), from 5 countries after 24 months of study. An in-depth analysis of the laboratory findings is still impossible, as both FOR-DMD and BON-DMD are ongoing and the randomization into the therapeutic GC regimen, as well as BMD or fracture data, have not been released yet.

We can report an increase of serum levels of 25-OH D (18.5±5.8 ng/mL at T0 and 28.8±13.2ng/mL at T24), with a corresponding reduction in PTH levels (27.8±8.4 pg/mL at T0 and 25.3±9.8 pg/mL at T24). We observed a decrease of bone formation markers: OC (61.5±15.4 ng/mL at T0 and 46.6±27.5 ng/mL at T24), BSAP (45±12 µg/L at T0 and 38.8±14.4 µg/L at T24) and ALP (137.3±32.9 U/L at T0 and 113.4±38.1 U/L at T24), as well as of bone resorption markers: CTx (914.4±295.4 pg/mL at T0 and 681.9±342 pg/mL at T24) and NTx (731.7±402.6nM BCE/mM Crea at T0 and 454.1±319.4 nM BCE/mM Crea at T24), indicating an overall reduction of bone turnover. The increased RANKL/OPG ratio (133.7±179.5 at T0 and 172.8±186.2 a T24) shows some prevalence of the bone resorption processes. Moreover, as expected with GC treatment, the serum concentrations of the inflammatory cytokine IL-6 showed a decrease (2.2±2.7 pg/mL at T0 and 1.4±1.3 pg/mL at T24).

The final analysis of the biochemical data on the whole study population, taking into account the BMD changes and the prevalence of fractures, will hopefully allow a deeper understanding of bone metabolism in GC-treated DMD boys.

Aggiornamenti sul progetto Bone-DMD: marcatori biochimici

Nella Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) sono state osservate ridotta densità minerale ossea (BMD) ed aumentata frequenza di fratture sia vertebrali che appendicolari. Purtroppo si conosce

ancora poco sul metabolismo osseo in questa patologia.

Per questo motivo, è stato avviato il progetto BON-DMD (GUP11011) – studio prospettico supplementare nell’ambito di un progetto multicentrico internazionale (FOR-DMD), coinvolgente 40 centri in 5 paesi. Il FOR-DMD è mirato a valutare l’efficacia e la sicurezza di tre diversi regimi terapeutici con GCs, in più di 200 bambini affetti da DMD, prepuberi (età 4-7 a.), deambulanti, non ancora in terapia steroidea, trattati con adeguati supplementi di vitamina D, e randomizzati in uno dei tre regimi terapeutici previsti (terapia giornaliera o intermittente con prednisone, terapia giornaliera con deflazacort). In questi soggetti, il BON-DMD è mirato allo studio, nell’arco di 36 mesi, del metabolismo e del turnover osseo (test di laboratorio standard), delle fratture, e dei cambiamenti nella BMD, valutata con metodo DXA. Gli esami biochimici considerati sono: (a) sul siero: paratormone (PTH), 25-OH vitamina D (25-OH D), osteocalcina (OC), fosfatasi alcalina ossea (BSAP), telopeptide C-terminale del Collagene di tipo I (CTx), ligando del recettore attivatore del fattore nucleare kappa-B (RANKL), osteoprotegerina (OPG), interleuchina 6 (IL-6); (b) sull’urina: telopeptide N-terminale del Collagene di tipo I (NTx).

Presentiamo ora i risultati preliminari su un sottogruppo di 45 bambini con DMD (età media all’arruolamento  $5.0 \pm 0.8$  a.), di varia nazionalità (1 canadese, 4 tedeschi, 14 inglesi, 11 italiani, 15 americani), nei primi 24 mesi dello studio. Poiché il BON-DMD è ancora in corso, l’assegnazione dei singoli soggetti allo specifico regime terapeutico e i dati densitometrici o relativi alle fratture non sono ancora stati resi noti, cosa che impedisce un’analisi approfondita delle attuali osservazioni.

È stato in primo luogo osservato un aumento della concentrazione sierica della 25-OH D, con corrispondente riduzione dei livelli di PTH. Allo stesso tempo, è stata osservata una diminuzione delle concentrazioni sia dei marcatori biochimici di osteoformazione: OC e BSAP, sia di quelli di riassorbimento osseo: CTx e NTx, indicando una complessiva riduzione del turnover osseo. L’aumento del rapporto fra le citochine RANKL/OPG indica comunque una certa prevalenza dei processi di riassorbimento. Inoltre, come atteso a seguito della terapia steroidea, le concentrazioni sieriche della citochina infiammatoria IL-6 mostrano una riduzione.

Completare l’analisi dei dati biochimici relativi all’intera popolazione arruolata, considerando anche le variazioni della BMD e la prevalenza delle fratture, permetterà di comprendere meglio il metabolismo osseo nei bambini DMD trattati con GCs.

1. Talim B, Malaguti C, Gnudi S, Politano L, Merlini L. Vertebral compression in Duchenne muscular dystrophy following deflazacort. *Neuromuscul Disord* 2002;12:294-295.
2. Bianchi ML, Mazzanti A, Galbiati E, Saraifoger S, Dubini A, Cornelio F, Moranti L. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int* 2003;14:761-767.
3. Bothwell JE, Gordon KE, Dooley JM, MacSween J, Cummings EA, Salisbury S. Vertebral fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Pediatr (Phila)* 2003;42:353-356.
4. Aparicio LF, Jurkovic M, DeLullo J. Decreased bone density in ambulatory patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *J Pediatr Orthop* 2002;22:179-181.
5. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop* 2000;20:71-74.
6. Bianchi ML, Morandi L, Andreucci E, Vai S, Frasunkiewicz J, Cottafava R. Low bone density and bone metabolism alterations in Duchenne muscular dystrophy: response to calcium and vitamin D treatment. *Osteoporos Int* 2011;22:529-539.
7. Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, Pierroz D, Morandi L, De Simone M, Rucci N, Bertini E, Bianchi ML, De Benedetti F, Teti A. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res* 2011;26:1891-1903.

8- Söderpalm AC, Magnusson P, Ahlander AC, Karlsson J, Kroksmark AK, Tulinius M, Swolin-Eide D. Lo. w bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2007;17:919-28.

Distrofia Muscolare di Duchenne

Coordinator: Maria Luisa Bianchi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2011

**Telethon Project (nr):**

GUP11011

**Disease Name:**

Duchenne Muscular Dystrophy

**Keywords:**

Duchenne Muscular Dystrophy, bone mineral density, bone turnover markers



## Poster P.01.3

### DETRIMENTAL ROLE OF COMPLEMENT C1/WNT AXIS IN DYSTROPHIC MUSCLE

Florio F.\*, Papa F., Libergoli M., Accordini S., Gharat V., Biressi S.

*1 Dulbecco Telethon Institute, University of Trento ~ Trento ~ Italy*

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common inherited muscle disease of childhood. Although under normal conditions muscle stem cells present a very powerful regenerative response, the regenerative potential is progressively lost in patients affected by DMD and fibrotic tissue progressively replaces muscle fibers leading to an impairment of muscle function.

Recent observations from different laboratories, including our, are indicating that an elevated WNT-signaling in dystrophic muscles plays a detrimental role in the regenerative process and promotes the accumulation of fibrotic tissue<sup>1,2</sup>. Still, the molecular and cellular events responsible for the elevated WNT-signaling in dystrophic muscle are completely unexplored. Importantly, in addition to the role in innate immunity, the complement complex C1q has been recently reported to activate the canonical WNT-signaling<sup>3</sup>. Based on these observations we formulated the hypothesis that complement C1 complex could be responsible for the enhanced activity of the WNT-signaling pathway in DMD. By combining in vitro and in vivo approaches, we obtained compelling evidence supporting this idea. In particular, our observations indicate that cells colonizing the muscles of the dystrophic mdx mice can secrete distinct subunits of the complement complex C1 and can therefore act as combinatorial source of WNT-activity.

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è la malattia muscolare genetica infantile più comune. Sebbene in condizioni normali le cellule staminali muscolari presentino una risposta rigenerativa molto potente, il potenziale rigenerativo si perde progressivamente nei pazienti affetti da DMD e il tessuto fibrotico sostituisce progressivamente le fibre muscolari portando ad una compromissione della funzione muscolare.

Recenti osservazioni di diversi laboratori, incluso il nostro, indicano che un'elevata attivazione della via del segnale del WNT nei muscoli distrofici svolge un ruolo dannoso nel processo rigenerativo e promuove l'accumulo di tessuto fibrotico<sup>1,2</sup>. Tuttavia, gli eventi molecolari e cellulari responsabili dell'elevata attivazione della via del WNT sono completamente inesplorati. È importante sottolineare che, oltre al ruolo nell'immunità innata, il complesso di complemento C1q è stato recentemente segnalato essere capace di attivare la via del segnale di WNT<sup>3</sup>. Abbiamo quindi formulato l'ipotesi che il complesso del complemento C1 potrebbe essere responsabile dell'aumento della attività della via del segnale di WNT nella DMD. Combinando approcci in vitro e in vivo, abbiamo ottenuto diverse evidenze a sostegno di questa idea.

1. Biressi, S. et al. A Wnt-TGF $\beta$ 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice. *Sci. Transl. Med.* 6, 267ra176–267ra176 (2014).
2. Trenz, F. et al. A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 299, C939–C947 (2010).
3. Naito, A. T. et al. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 149, 1298–1313 (2012).

Distrofia Muscolare di Duchenne

Coordinator: Stefano Biressi  
Duration (N. Years): 5  
Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

TCP 13007

**Disease Name:**

Duchenne Muscular Dystrophy

**Keywords:**

Duchenne muscular dystrophy, Stem cell dysfunction, Fibrosis

## Poster P.01.4

### IDENTIFICATION OF A TWO NOVEL SUBPOPULATIONS OF SATELLITE CELLS WITH DIFFERENT KINETICS OF ACTIVATION

Libergoli M.\*<sup>[1]</sup>, Kheir E.<sup>[1]</sup>, Florio F.<sup>[1]</sup>, Torrente Y.<sup>[2]</sup>, Biressi S.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dulbecco Telethon Institute, CIBio, University of Trento ~ Trento ~ Italy, <sup>[2]</sup>3 Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milan ~ Italy

Previous work from our laboratory in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy demonstrated that satellite cells (SCs) progressively acquire fibrotic features during the progression of the disease. In the process of characterizing this aberrant behavior, we serendipitously discovered that muscle SCs might be separated into two distinct subpopulations based on the expression of a mesenchymal stem cell “signature.” Crucially, this separation does not correlate with the acquisition of fibroblast features; rather it separates the pool of SCs in two subpopulations, both maintaining myogenic properties in healthy muscles. These two newly identified subpopulations (1) do not overlap with any previously reported subpopulation and may be prospectively isolated; (2) present a different response in terms of kinetics of activation and differentiation during the regenerative process induced by acute muscle damage; (3) show a different propensity to enter in G(alert) state upon distal injury; (4) contain a different amount of mitochondria; (5) are present in a different proportion in distinct muscle groups. Moreover, (6) one of the two subpopulations can give rise to the other and therefore appears to be upstream in the lineage hierarchy. Importantly, (7) although the two subpopulations of SCs are numerically similar in healthy limb muscles, one of the two subpopulations is progressively lost with time in dystrophic mdx mice. Based on these data we are hypothesizing that an imbalance between the two newly identified subpopulations may impair regeneration in dystrophic muscles. These observations not only increase our knowledge of the molecular and cellular dynamics that are controlling normal and pathological muscle homeostasis but also open the possibility that restoring the proper functional equilibrium between subpopulations of SCs may counteract the progression of the dystrophic disease.

Precedenti lavori del nostro laboratorio sul modello animale di distrofia muscolare di Duchenne mdx hanno dimostrato che le cellule staminali dei muscoli (cellule satelliti) acquisiscono delle caratteristiche fibrotiche durante la progressione della malattia. Nel processo di caratterizzazione di questo comportamento aberrante, abbiamo scoperto che le cellule satelliti muscolari possono essere separate in due distinte sottopopolazioni basate sull'espressione di specifici marcatori mesenchimali. E' importante evidenziare che questa separazione non è correlata all'acquisizione di caratteristiche fibroblastiche; piuttosto separa il pool di cellule satelliti in due sottopopolazioni, che mantengono entrambe proprietà miogeniche nei muscoli sani. Queste due sottopopolazioni appena identificate (1) non si sovrappongono a nessuna sottopopolazione precedentemente identificata; (2) presentare una risposta diversa in termini di cinetica di attivazione e differenziazione durante il processo rigenerativo indotto da danno muscolare acuto; (3) contengono una diversa quantità di mitocondri. È importante sottolineare che sebbene le due sottopopolazioni di cellule satelliti siano numericamente simili nei muscoli degli arti sani, una delle due sottopopolazioni si perde progressivamente nei topi distrofici mdx. Sulla base di questi dati stiamo ipotizzando che uno squilibrio tra le due sottopopolazioni appena identificate possa compromettere la rigenerazione dei muscoli distrofici. Queste osservazioni non solo

aumentano la nostra conoscenza delle dinamiche molecolari e cellulari che controllano l'omeostasi muscolare normale e patologica, ma aprono anche alla possibilità che il ripristino del giusto equilibrio funzionale tra sottopopolazioni di cellule satelliti possa contrastare la progressione della distrofia.

1. Biressi, S. et al. A Wnt-TGF $\beta$ 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice. *Sci. Transl. Med.* 6, 267ra176–267ra176 (2014).
2. Biressi, S. and Rando, T.A. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin Cell Dev Biol.* 21 (8), 845-854 (2010).

Distrofia Muscolare di Duchenne

Coordinator: Stefano Biressi

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

TCP 13007

**Disease Name:**

Duchenne Muscular Dystrophy

**Keywords:**

Duchenne muscular dystrophy, Stem cells, Heterogeneity

## Poster P.01.5

### A POSSIBLE STRATEGY TO INDUCE EXON 45 SKIPPING IN DMD-D44 PATIENTS THROUGH THE MODULATION OF CELF2A SPLICING FACTOR

**Martone J.\***<sup>[1]</sup>, Lisi M.<sup>[1]</sup>, Castagnetti F.<sup>[1]</sup>, Rosa A.<sup>[2]</sup>, Di Carlo V.<sup>[3]</sup>, Sthandier O.<sup>[1]</sup>, Di Croce L.<sup>[3]</sup>, Bozzoni I.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Biology and Biotechnology Charles Darwin, Sapienza University of Rome, Italy ~ Rome ~ Italy, <sup>[2]</sup>Center for Life Nano Science@Sapienza, Istituto Italiano di Tecnologia, Rome, Italy ~ rome ~ Italy, <sup>[3]</sup>Centre for Genomic Regulation, The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain. ~ Barcelona ~ Spain

We previously characterized a Duchenne Muscular Dystrophy patient (GS $\square$ 44), carrying the deletion of exon 44, who showed a milder phenotype than expected for a Duchenne patient. We showed that GS $\square$ 44 produces 7% of dystrophin thanks to the ability to undergo endogenous exon 45 skipping which enables the formation of a mRNA with a restored ORF (fusion of ex 43-46). Exon 45 skipping correlated with the lack of Celf2a, a muscle specific isoform of the Celf2 splicing factor, which was shown to bind the exon 45 region and to be important for its efficient inclusion in the mature mRNA. Moreover, the expression of Celf2a was absent in myocytes derived from fibroblast obtained from the mother of GS $\square$ 44, suggesting the hereditary transmission of Celf2a silencing.

Following experiments allowed us to show that CRISPR/Cas9 inactivation of Celf2a, in myocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) of an unrelated patient carrying a  $\square$ 44 deletion, produced skipping of exon 45, indicating that ablation of this factor could be curative for all those cases where skipping of exon 45 can recover a functional ORF. We also show that the lack of Celf2a expression in the GS $\square$ 44 patient is due to an epigenetic control mediated by a chromatin-associated lncRNA. This RNA, while expressed in GS $\square$ 44, is instead absent in control myoblasts. Interestingly, depletion of this lncRNA in GS $\square$ 44 myoblasts rescued Celf2a expression, while its overexpression in control myoblasts repressed it.

La Distrofia muscolare di Duchenne è una malattia rara caratterizzata da una progressiva degenerazione muscolare dovuta all'assenza di una proteina nota come Distrofina. I pazienti affetti da questa patologia perdono la capacità di camminare intorno ai 14 anni ed in genere la morte sopraggiunge durante la terza/quarta decade di vita a causa di arresto cardiaco o insufficienza respiratoria. Partendo dall'osservazione che alcuni pazienti mostrano un fenotipo più lieve, abbiamo deciso di investigare le "cause molecolari" di questo miglioramento per capire se queste "modifiche" potessero essere utili per migliorare le condizioni di vita di altri pazienti affetti dalla stessa patologia. Analizzando nel dettaglio un singolo paziente abbiamo identificato una proteina, CELF2a, la cui assenza consente al paziente in esame di produrre un pò di Distrofina, determinando così un fenotipo più lieve. Abbiamo in seguito studiato l'effetto dell'eliminazione di CELF2a sulla produzione della proteina Distrofina in cellule muscolari derivate da un altro individuo affetto da Duchenne. Effettivamente l'eliminazione di CELF2a ha consentito di ripristinare la produzione di Distrofina, seppur in bassa percentuale. Questi dati suggeriscono che in una sottopopolazione di pazienti, ovvero quelli caratterizzati da mutazioni nel gene della Distrofina che risultano curabili tramite l'eliminazione dell'esone 45, l'inibizione di CELF2a potrebbe avere un effetto terapeutico sia da solo che in combinazione con altre strategie. Abbiamo inoltre identificato il meccanismo molecolare che determina la mancanza di CELF2a nel paziente iniziale. In particolare, l'assenza di questa proteina non è dovuta a mutazioni di questo gene ma ad alterazioni nella sua regolazione.

Martone J, Briganti F, Legnini I, Morlando M, Picillo E, Sthandier O, Politano L, Bozzoni I. The lack of the Celf2a splicing factor converts a Duchenne genotype into a Becker phenotype. Nat Commun. (2016) 7:10488.

Distrofia Muscolare di Duchenne

Coordinator: Irene Bozzoni

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GPP16213

**Disease Name:**

Duchenne Muscular Dystrophy

**Keywords:**

Duchenne muscular Dystrophy, Splicing and exon skipping, Epigenetic control

## Poster P.01.6

### EXTRACELLULAR ATP AND T REGULATORY CELLS: NEW THERAPEUTICS TARGETS IN ALPHA-SARCOGLYCAN DEFICIENT MUSCULAR DYSTROPHY (LGMD2D)

**Baratto S.\*<sup>[1]</sup>**, Principi E.<sup>[1]</sup>, Del Zotto G.<sup>[2]</sup>, Antonini F.<sup>[2]</sup>, Panicucci C.<sup>[1]</sup>, Ognio E.<sup>[3]</sup>, Bruzzone S.<sup>[4]</sup>, Benzi A.<sup>[4]</sup>, Gazzo E.<sup>[5]</sup>, Minetti C.<sup>[6]</sup>, Raffaghello L.<sup>[1]</sup>, Bruno C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Center of Translational and Experimental Myology, Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Research and Diagnostics, Istituto G. Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Animal Facility, IRCSS Ospedale Policlinico San Martino ~ Genova ~ Italy, <sup>[4]</sup>Department of Experimental Medicine, Section of Biochemistry, University of Genoa ~ Genova ~ Italy, <sup>[5]</sup>Charité Universität-Experimental and Clinical Research Center ~ Berlin ~ Germany, <sup>[6]</sup>Pediatric Neurology and Muscle Disease Unit, Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy

Limb girdle muscular dystrophy (LGMD2D), an inherited disorder resulting from mutations in the  $\alpha$ -sarcoglycan gene, is further aggravated by chronic inflammation that is finely modulated by extracellular ATP (eATP)/purinoreceptors axis. In particular, the blockade of the eATP/P2X purinergic signalling by a non selective purinoreceptor antagonist delays the dystrophic disease progression and dampens the local inflammatory response in Sgca null mice.

Aims of this study is to evaluate the therapeutic effectiveness of P2X7 pharmacological inhibition in Sgca mice and to characterize the role of eATP/P2 purinergic receptors on human SGC myoblasts.

Treatment of Sgca mice with P2X7 selective antagonist A438079 (A43), administered by intraperitoneal injection every two days at 3 mg/Kg for 12 weeks, significantly improves muscular function evaluated by the Four Limb Hanging test. Serum CK concentrations, a marker of muscle cell degeneration, are slightly decreased in A43-Sgca vs untreated mice. Immunophenotypical analysis by flow cytometry indicates that myeloid infiltrates from limb muscles are significantly reduced in A43-Sgca vs untreated mice. We observe a marked decrease of CD45+/CD11b+/Ly6G+ neutrophils, CD45+/CD11b+/Ly6G-/Ly6C+ activating monocytes, and CD45+/F4/80+ macrophages in A43-Sgca vs untreated animals. In contrast, no quantitative differences in lymphoid infiltrates are observed with the only two exception of CD45+/CD3+/CD1d+ NKT cells which are significantly decreased and CD45+/CD4+/CD25+/Foxp3+ regulatory T cells which are slightly increased in A43-Sgca mice. No quantitative differences in lymphoid and myeloid cell populations are observed in the spleen and peripheral blood of A43-Sgca in comparison to the untreated mice.

To further investigate the eATP/purinoreceptor axis in human samples, we evaluated ATP release and ecto-ATPase activity in myoblasts derived from patients affected by LGMD2D, compared to negative control myoblasts. Our data indicate that ATP release upon cell stimulation with TNF $\alpha$  or with a mechanical stress, is remarkably higher from LGMD2D myoblasts than from control cells. In agreement with the results obtained in Sgca mice, myoblasts from LGMD2D patients exhibit a decreased ecto-ATPase enzymatic activity compared to negative controls. Moreover, eATP, at concentrations in the low micromolar range, has been shown to increase intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration by both P2X and P2Y receptors in myoblasts and myotubes from LGMD2D patients, and not in control cells.

In conclusion, our results indicate that human LGMD2D myoblasts/myotubes are more sensitive to the presence of eATP which is higher in the dystrophic muscular microenvironment and might be responsible of the increased inflammatory infiltrate. In this connection, specific P2X7 pharmacological inhibition might provide a therapeutic approach to slow the disease progression by modulating the

innate immune responses.

Il ruolo dell'ATP e dei recettori purinergici nella distrofia muscolare dei cingoli da deficit di alfa-sarcoglicano (LGMD2D): nuove prospettive terapeutiche

La distrofia muscolare dei cingoli da deficit di alfa-sarcoglicano (LGMD2D), patologia ereditaria causata da mutazioni del gene sarcoglicano, è ulteriormente aggravata dalla presenza di infiammazione cronica finemente modulata da molecole altamente dannose quali l'ATP.

L'ATP viene rilasciato dalle fibrocellule muscolari distrofiche esercitando un'azione tossica a seguito dell'interazione con i recettori purinergici, tra cui il P2X7.

Un nostro recente studio condotto su topi con deficit di alfa-sarcoglicano (Sgca) ha dimostrato che il blocco farmacologico dell'asse ATP/recettori purinergici causa una riduzione dei processi infiammatori ed un rallentamento della progressione della malattia.

Lo scopo di questo progetto è quello di i) valutare l'efficacia terapeutica dell'inibizione farmacologica del recettore P2X7 in topi Sgca e ii) caratterizzare il ruolo dell'ATP rilasciato extracellularmente e dei recettori purinergici in mioblasti isolati da pazienti con LGMD2D.

A tal fine è stato utilizzato un farmaco, denominato A438079 (A43), che blocca in modo selettivo il recettore P2X7. Topi Sgca trattati con A43 presentano un miglioramento della funzione muscolare ed una riduzione del CK sierico, noto marcatore di degenerazione muscolare. Inoltre, è stato osservato che a livello dei muscoli degli arti inferiori, questa molecola riduce significativamente la percentuale di diverse cellule infiammatorie tra cui neutrofili, monociti attivati e macrofagi. Al contrario, in altri tessuti, quali la milza ed il sangue periferico, non si osservano differenze quantitative nelle varie popolazioni cellulari infiammatorie.

Parallelamente, abbiamo caratterizzato gli effetti mediati dall'ATP extracellulare e dei recettori purinergici in mioblasti umani isolati da pazienti affetti da LGMD2D.

Nei mioblasti di pazienti LGMD2D il rilascio di ATP è risultato significativamente maggiore rispetto a quelli di controllo, così come l'aumento del calcio intracellulare.

In conclusione, i nostri risultati indicano che le cellule muscolari di pazienti affetti da LGMD2D sono più sensibili alla presenza di ATP che, a sua volta, è più alta nel microambiente muscolare distrofico e, come tale, potrebbe essere responsabile dell'aumento dell'infiltrato infiammatorio. A questo proposito, la specifica inibizione farmacologica del recettore P2X7 potrebbe rappresentare un promettente approccio terapeutico per rallentare la progressione delle sarcoglicanopatie modulando la risposta infiammatoria.

-Sandonà D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert. Rev. Mol. Med.*, 2009; 11:e28.

-Khakh BS, North RA: P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 2006, 442:527-532.

-Gazzerro E, Baldassari S, Assereto S, Fruscione F, Pistorio A, Panicucci C, Volpi S, Perruzza L, Fiorillo C, Minetti C, Traggiai E, Grassi F, Bruno C: Enhancement of Muscle T Regulatory Cells and Improvement of Muscular Dystrophic Process in mdx Mice by Blockade of Extracellular ATP/P2X Axis. *Am J Pathol* 2015, 185:3349-3360.

-Gazzerro E, Baratto S, Assereto S, Baldassari S, Panicucci C, Raffaghello L, Scudieri P, De Battista D, Fiorillo C, Volpi S, Chaabane L, Malnati M, Messina G, Bruzzone S, Traggiai E, Grassi F, Minetti C, Bruno C. (2018) The Danger Signal Extracellular ATP Is Involved in the Immunomediated Damage of



$\alpha$ -Sarcoglycan-Deficient Muscular Dystrophy. Am J Pathol., 2018 S0002-9440(17)31150-1.  
-Sinadinos A, Young CN, Al-Khalidi R, Teti A, Kalinski P, Mohamad S, Floriot L, Henry T, Tozzi G, Jiang T, Wurtz O, Lefebvre A, Shugay M, Tong J, Vaudry D, Arkle S, doRego JC, Górecki DC: P2RX7 purinoceptor: a therapeutic target for ameliorating the symptoms of Duchenne muscular dystrophy. PLoS Med 2015, 12:e1001888.  
-Sandonà D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R: Characterization of the ATP-hydrolyzing activity of alpha-sarcoglycan. Biochem J 2004, 381:105-112.  
-Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA, Wakefield LM, Woodcock J. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. Science Translational Medicine, 2015, 7(299):299rv4.  
-Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG, Margeta M, Spencer MJ, Bluestone JA. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. Science Translational Medicine, 2014, 6(258):258ra142.

Distrofia Muscolare dei cingoli di tipo 2D

Coordinator: Claudio Bruno  
Duration (N. Years): 2  
Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17192

**Disease Name:**

Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2D (LGMD2D)

**Keywords:**

Limb Girdle Muscular Dystrophy, Inflammation, ATP

## Poster P.01.7

### MODULATION OF THE CYCLIN INHIBITOR P27 TO AMELIORATE MEROSIN DEFICIENT CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY (MDC1A)

Porrello E., Tonlorenzi R., Bonaccorso R., Previtali S.C.\*

*Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy*

MDC1A, or LAMA2 disease, is a severe autosomal recessive disorder due lack of laminin211. The disease is characterized by muscular dystrophy, peripheral neuropathy and brain abnormalities. The disease is recapitulated by different animal models.

Previous findings from the principal investigator suggest that tissue degeneration in Lama2 mice may be due to dysregulated levels of Jab1 and downstream molecules, and rescued levels may ameliorate the disease. In this project we are evaluating whether this strategy might constitute a therapeutic option in the future.

Preliminary genetic and pharmacological results by modulating p27 expression in in vitro and in vivo studies reveal promising findings in peripheral nerve function and in skeletal muscle differentiation.

Modulazione della molecola p27 per migliorare la distrofia muscolare congenita da deficit di merosina (MDC1A).

La distrofia muscolare congenita da deficit di merosina, o LAMA2, è una malattia autosomica recessiva dovuta alla mancanza di laminina211 nei tessuti. La malattia è caratterizzata dallo sviluppo di una distrofia muscolare, una neuropatia, e anomalie cerebrali. La malattia è riprodotta nei suoi vari aspetti da modelli animali.

Precedenti risultati del nostro gruppo avevano riscontrato che una disregolazione del gene Jab1 e delle molecole da esso controllate potesse essere coinvolto nello sviluppo della malattia. Scopo dello studio è verificare se un riequilibrio di queste molecole possa migliorare il decorso della malattia.

Risultati preliminari ottenuti mostrano come modulando la molecola p27 si ottenga un miglioramento della funzione del nervo e della differenziazione delle fibre muscolari.

Jab1 regulates Schwann cell proliferation and axonal sorting through p27. Porrello E, Rivellini C, Dina G, Triolo D, Del Carro U, Ungaro D, Panattoni M, Feltri ML, Wrabetz L, Pardi R, Quattrini A, Previtali SC. J Exp Med. 2014 Jan 13;211(1):29-43. doi: 10.1084/jem.20130720. Epub 2013 Dec 16.

Distrofia Muscolare Congenita da deficit di Merosina

Coordinator: Stefano Carlo Previtali

Duration (N. Years): 3

Starting year:2018

**Telethon Project (nr):**

GGP17009

**Disease Name:**

Merosin Deficient Congenital Muscular Dystrophy

**Keywords:**

muscular dystrophy, peripheral neuropathy, therapy

## Poster P.01.8

### USEFUL: USER- CENTRED ASSISTIVE SYSTEM FOR ARM FUNCTIONS IN NEUROMUSCULAR SUBJECTS

Gandola M.<sup>[1]</sup>, Longatelli V.<sup>[1]</sup>, Antonietti A.<sup>[1]</sup>, D'Angelo G.<sup>[2]</sup>, Biffi E.<sup>[2]</sup>, Diella E.<sup>[2]</sup>, Molteni F.<sup>[3]</sup>, Rossini M.<sup>[3]</sup>, Pedrocchi A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Politecnico di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Scientific Institute "Eugenio Medea" ~ Bosisio Parini ~ Italy, <sup>[3]</sup>Villa Beretta Rehabilitation Center ~ Costa Masnaga ~ Italy

#### Introduction

People affected by neuromuscular disorders, such as Muscular Dystrophy (MD), experience limitations in performing daily living activities. The key concept of USEFUL project is to contrast the everyday experience of MD people of losing upper limbs functions by providing them with Assistive Devices (ADs) able to exploit their own residual capabilities.

#### Methods

Clinical Trial design – The effectiveness of two commercial antigravity ADs (Armon, Ayura and Wrex, Jaeco) was evaluated by means of a crossover randomized controlled trial. Considering 80% power, 0.05 significance level, and a minimal clinically important difference for PUL module equals to 12, a sample of 38 subjects was obtained.

Participants – 32 patients affected by Duchenne, Becker or Limb Girdle MD were up to now enrolled at the IRCCS Medea (Bosisio Parini, LC, Italy) and at the Rehabilitation Institute Villa Beretta (Costa Masnaga, LC, Italy). Patients were divided in 3 groups according to MRC index [1] at deltoid level: i) slightly impaired ( $MRC \geq 2.5$ ), ii) moderately impaired ( $1 \leq MRC < 2.5$ ), and iii) severely impaired patients ( $MRC \leq 1$ ).

Outcome measures – PUL module [2] to externally assess functionality without (@T0, baseline) and with (@T1, after a short training) device(s); Abilhand questionnaire [3] to self-evaluate functionality without (@T0) and with (@T1) device(s); SUS scale [4] to evaluate ADs usability. Wilcoxon test was used to compare PUL and Abilhand scores for each impairment group @T0 and @T1; SUS results were interpreted as in [5].

#### Results

Slightly impaired group (13) – No significant differences have been detected in both PUL (p-value = 0.177 Armon; p-value = 0.163 Wrex) and Abilhand (p-value = 0.415 Armon; p-value = 0.859 Wrex) for both devices. Armon usability was evaluated as "excellent", while Wrex as "good".

Moderately impaired group (10) – Substantial functional benefit from ADs use demonstrated by significant improvements in PUL with both Armon (p-value=0.018) and Wrex (p-value=0.017). In Abilhand, significant improvements were obtained again with both devices (p-value=0.028 Armon, p-value = 0.600 Wrex). Armon usability was scored as "excellent", while Wrex as "good".

Severely impaired group (9) – Different behavior between Armon and Wrex in the PUL module, scoring significant improvements with Armon (p-value = 0.028), but not with Wrex (p-value = 0.063). Similarly, with Abilhand users recognized significant self-perceived improvements with Armon (p-value = 0.043), but not with Wrex (p-value = 0.173). Both ADs were classified with a "good" usability.

#### Discussion

Upper limb ADs can help MD patients increasing their ability in performing several tasks (e.g., reaching the face), depending on their residual ability. Armon achieved better results in all considered

outcomes and it was indicated for a wider population, from less impaired to severely impaired patients. Wrex is, instead, suggested only for slightly or moderately impaired patients.

USEFUL: sistemi assistivi paziente-centrici per il supporto dell'arto superiore in pazienti neuromuscolari

#### Introduzione

Persone con disturbi neuromuscolari, come la distrofia muscolare (MD), sperimentano limitazioni nelle attività quotidiane. L'obiettivo del progetto USEFUL è contrastare l'esperienza quotidiana di perdita delle funzioni degli arti superiori delle persone con MD, fornendo loro dispositivi di assistenza (AD) in grado di sfruttare le proprie capacità residue.

#### Metodi

Design dello studio – L'efficacia di due AD commerciali antigravitari (Armon Ayura e Wrex Jaeco) è stata valutata in uno studio controllato randomizzato crossover. Considerando 80% di potenza, livello di significatività 0,05 e una differenza minima clinicamente significativa per il modulo PUL di 12, si è ottenuto un campione di 38 soggetti.

Partecipanti – 32 pazienti affetti da MD di Duchenne, Becker o Cingoli sono stati reclutati ad oggi presso l'IRCCS Medea (Bosisio Parini, Italia) e Villa Beretta (Costa Masnaga, Italia). I pazienti sono stati divisi in 3 gruppi in base all'indice MRC [1] a livello del deltoide: i) lievemente compromessi ( $MRC \geq 2.5$ ), ii) moderatamente compromessi ( $1 \leq MRC < 2.5$ ) e iii) gravemente compromessi ( $MRC \leq 1$ ).

Variabili – Modulo PUL [2] per valutare la funzionalità senza (@T0 baseline) e con (@T1 dopo un breve training) AD; questionario Abilhand [3] per auto-valutare la funzionalità senza (@T0) e con (@T1) AD; scala SUS [4] per valutare l'usabilità delle AD. Il test di Wilcoxon è stato usato per comparare i punteggi PUL e Abilhand per ogni gruppo a @T0 e @T1; la scala SUS è stata interpretata come in [5].

#### Risultati

Pazienti lievemente compromessi (13) – Non sono state rilevate differenze significative per la PUL (p-value=0.117 Armon; p-value=0.163 Wrex) e per l'Abilhand (p-value=0.415 Armon; p-value=0.859 Wrex) per entrambe le AD; l'usabilità di Armon è "eccellente", mentre quella di Wrex "buona".

Pazienti moderatamente compromessi (10) – Il gruppo ha ottenuto un beneficio funzionale sostanziale dell'uso delle AD, dimostrato dalla PUL sia con Armon (p-value=0.018) che con Wrex (p-value=0.017). Tuttavia, nell'Abilhand si sono registrati aumenti significativi solo con Armon (p-value=0.028 Armon, p-value=0.600 Wrex). L'usabilità di Armon è "eccellente", quella di Wrex "buona".

Pazienti gravemente compromessi (9) – Comportamento diverso tra Armon e Wrex sia nel modulo PUL, con miglioramenti significativi con Armon (p-value=0.028), ma non con Wrex (p-value=0.063), sia nell'Abilhand (p-value=0.043 Armon; p-value=0.173 Wrex). Le AD sono state classificate con "buona" usabilità.

#### Discussione

Le AD analizzate aiutano i pazienti con MD nello svolgimento di vari compiti (e.g. raggiungere il viso), in base alla capacità residua. Armon ha ottenuto risultati migliori e si dimostra indicato per una popolazione più ampia, da pazienti con minor compromissione a grave compromissione. Wrex è consigliato solo per pazienti con compromissione lieve o moderata.

[1] Compston. Aids to the Investigation of Peripheral Nerve Injuries. Medical Research Council: Nerve Injuries Research Committee. His Majesty's Stationery Office: 1942; pp. 48 (iii) and 74 figures and 7 diagrams; with Aids to the Examination of the Peripheral Nervous System. By Michael O'Brien for the Guarantors of Brain. Saunders Elsevier: 2010; pp. [8] 64 and 94 Figures. Brain 2010, vol. 133, pp. 2838–2844.

[2] Mayhew et al. Development of the Performance of the Upper Limb module for Duchenne muscular dystrophy,” *Developmental Medicine and Child Neurology* 2013, vol. 55, pp. 1038–1045.

[3] Vandervelde et al. Validation of the ABILHAND questionnaire to measure manual ability in children and adults with neuromuscular disorders,” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2010, vol. 81, pp. 506–512.

[4] Sauro. *A Practical Guide to the System Usability Scale: Background, Benchmarks & Best Practices*. Denver, CO: CreateSpace Independent Publishing Platform, 2011.

[5] Bangor et al. An Empirical Evaluation of the System Usability Scale,” *International Journal of Human–Computer Interaction* 2008, vol. 24, pp. 574–594.

Distrofia muscolare

Coordinator: Alessandra Pedrocchi

Partners: Grazia D'Angelo, Franco Molteni

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GUP15021

**Disease Name:**

Muscular Dystrophy

**Keywords:**

Muscular dystrophy, Assistive devices, Upper limbs

## 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.<sup>[1]</sup>, Cardinali B.<sup>[1]</sup>, Perfetti A.<sup>[2]</sup>, Mandillo S.<sup>[1]</sup>, Golini E.<sup>[1]</sup>, Strimpakos G.<sup>[1]</sup>, Voellenkle C.<sup>[2]</sup>, Longo M.<sup>[2]</sup>, Martelli F.<sup>[2]</sup>, **Falcone G.\*<sup>[1]</sup>**

<sup>[1]</sup>*Institute of Cell Biology and Neurobiology, National Research Council ~ Monterotondo (RM) ~ Italy, <sup>[2]</sup>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



## Poster P.01.10

### SMALL MOLECULES TO RESCUE FOLDING-DEFECTIVE SARCOGLYCANS: IN VIVO ASSESSMENT OF NOVEL THERAPEUTIC STRATEGIES

Sandona" D.\*<sup>[1]</sup>, Scano M.<sup>[1]</sup>, Fecchio C.<sup>[1]</sup>, Carotti M.<sup>[1]</sup>, Soardi M.<sup>[1]</sup>, Risato G.<sup>[1]</sup>, Sacchetto R.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Dep. of Biomedical Sciences (University of Padova) ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dept. Comparative Biomedicine and Food Science (University of Padova) ~ Legnaro (Padova) ~ Italy

Sarcoglycanopathies are rare genetic diseases in which the disruption of the sarcoglycan complex results in sarcolemma fragility and progressive muscle degeneration. Most of the reported cases are due to missense mutations originating a folding-defective sarcoglycan (SG) eliminated by the cells' quality control system, although potentially functional [1-4]. To recover the mutants and avoid complex disruption, we exploited the use of protein folding correctors belonging to the CFTR modulators family [5]. The effective rescue of different SG-mutants has been proved for a few of such molecules by using cell models and, importantly, myogenic cells from sarcoglycanopathy patients [6]. We also tested the combined administration of CFTR correctors, highlighting the additive or even synergic activity of such compounds.

To validate the pharmacological strategy in vivo we have been forced to generate novel animal models of sarcoglycanopathy expressing a folding-defective SG, overcoming the unsuitability of the mouse models available [7-9]. A conventional KI mouse was generated by the introduction of a pathogenic missense mutation in a highly conserved region of the mouse *sgcb* gene. Unfortunately, despite the mutation in  $\beta$ -SG, the SG-complex assembles and localizes at the sarcolemma and these mice show no sign of myopathy [10]. We postulate that the different outcome of sarcoglycan missense mutations in human and mouse is related to a more permissive mouse quality control system allowing part of the mutant to skip degradation. Thus, to obtain a reliable mouse model of the disease could be mandatory to control mutant expression, rigorously.

As a second strategy, we generated mice with transiently "humanized hinds". Indeed, the adeno associated viral transduction of the hinds of *sgca*-null mouse pups resulted in hinds expressing the endogenous  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -SG, and the human  $\alpha$ -SG (wild type or mutated) carried by the virus. By this way, we met the need of generating more than one model of the disease, and we had the possibility to control the amount of the mutated  $\alpha$ -SG expressed by the virus. No major effects on survival, body weight and general behavior have been observed in transduced animals. Histological and molecular characterization of the hind muscles from 2 months old mice evidenced the recovery of the dystrophic phenotype when the wild type sequence of the human  $\alpha$ -SG was transduced, while the presence of a mutated  $\alpha$ -SG resulted in pathologic features. Mice with "humanized hinds" were then chronically treated with the most promising CFTR corrector, by intra peritoneal injection. The molecular and histological analyses of the first samples reveal an increase of the  $\alpha$ -SG content, a reduction of the signs of myopathy and the re-localization of the SG-complex at the sarcolemma in comparison to the vehicle treated animals. Even though a great variability is present, this is the first in vivo evidence of the CFTR correctors efficacy in sarcoglycanopathy

Piccole molecole per il recupero di sarcoglicani con difetti di ripiegamento: verifica in vivo di nuove strategie terapeutiche

Le sarcoglicanopatie sono malattie genetiche rare che, alterando il complesso dei sarcoglicani (SG), causano una progressiva degenerazione muscolare. Molti dei casi sono dovuti a mutazioni missenso che generano un SG con difetti di folding che viene eliminato, anche se potenzialmente funzionante, dal sistema di controllo qualità della cellula. Per recuperare i mutanti, evitando la distruzione del complesso, abbiamo usato correttori del folding delle proteine, detti correttori del CFTR, sviluppati per la fibrosi cistica. Alcune di queste molecole permettono di recuperare con successo i mutanti dei SG espressi in modelli cellulari, ma soprattutto nelle cellule muscolari isolate dai pazienti con sarcoglicanopatia. Per proseguire lo sviluppo di questi composti, abbiamo dovuto generare dei nuovi modelli animali della malattia a causa della inadeguatezza di quelli attualmente disponibili. A questo scopo abbiamo prodotto un topo KI introducendo nella sequenza del gene murino una delle mutazioni umane più gravi del  $\beta$ -SG. Purtroppo, pur in presenza di un SG difettivo, il complesso si forma e localizza correttamente e gli animali non manifestano alcun segno di miopatia. Noi pensiamo che questo sia dovuto ad una minor accuratezza del sistema di controllo qualità del topo che permette ad una quota del SG mutato di sfuggire alla degradazione. E' dunque probabile che per generare un modello affidabile sia necessario controllare in modo stringente l'espressione della proteina di interesse.

Come seconda strategia, abbiamo pensato di "umanizzare" le zampe posteriori del topo mediante l'iniezione di un virus (AAD) portante la sequenza dell' $\alpha$ -SG umano (wild type o mutato). In questo modo abbiamo soddisfatto l'esigenza di creare più di un modello di sarcoglicanopatia, considerando le numerose mutazioni missenso responsabili della malattia, e abbiamo la possibilità di controllare l'espressione del SG mutato portato dal virus. L'uso del virus non ha avuto conseguenze su sopravvivenza, crescita e comportamento degli animali. A 2 mesi dall'iniezione del virus, la caratterizzazione istologica e molecolare dei muscoli delle "zampe umanizzate" ha evidenziato il recupero del fenotipo distrofico quando la sequenza usata era quella wild type e la presenza di caratteristiche miopatiche quando la sequenza dell' $\alpha$ -SG era mutata. Topi con le "zampe umanizzate" sono stati quindi trattati cronicamente con il correttore del CFTR più promettente, mediante iniezione intraperitoneale. Le analisi molecolari e istologiche dei primi campioni muscolari rivelano, rispetto ai trattati con il veicolo, un aumento della quantità di  $\alpha$ -SG, un recupero dei segni patologici e la localizzazione del complesso al sarcolemma. Nonostante l'alta variabilità dei risultati, questa è la prima evidenza in vivo dell'efficacia dei correttori del CFTR nelle sarcoglicanopatie.

- [1] Gastaldello S., D'Angelo S., Franzoso S., Fanin M., Angelini C., Betto R. and Sandonà D.: Inhibition of Proteasome Activity Promotes the Correct Localization of Disease-Causing  $\alpha$ -Sarcoglycan Mutants in HEK-293 Cells Constitutively Expressing  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -Sarcoglycan. *The American Journal of Pathology* 173: 170–181, 2008.
- [2] Sandonà D. and Betto R.: Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11, 2009.
- [3] Bianchini E., Fanin M., Mamchaoui K., Betto R. and Sandonà D.: Unveiling the degradative route of the V247M  $\alpha$ -sarcoglycan mutant responsible for LGMD-2D. *Human Molecular Genetics* 23: 3746–3758, 2014.
- [4] Carotti M., Fecchio C. and Sandonà D.: Emerging therapeutic strategies for sarcoglycanopathy. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 5: 381–396, 2017.
- [5] Bell S.C., De Boeck K. and Amaral M.D.: New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacology & Therapeutics* 145: 19–34, 2015.
- [6] Carotti M., Marsolier J., Soardi M., Bianchini E., Gomiero C., Fecchio C., Henriques S.F., Betto R., Sacchetto R., Richard I. and Sandonà D.: Repairing folding-defective  $\alpha$ -sarcoglycan mutants by CFTR

correctors, a potential therapy for limb-girdle muscular dystrophy 2D. *Human Molecular Genetics* 27: 969–984, 2018.

[7] Duclos F., Straub V., Moore S.A., Venzke D.P., Hrstka R.F., Crosbie R.H., Durbeej M., Lebakken C.S. and Ettinger A.J.: Progressive Muscular Dystrophy in  $\alpha$ -Sarcoglycan-deficient Mice. *The Journal of Cell Biology* 142: 11, 1998.

[8] Bartoli M., Gicquel E., Barrault L., Soheili T., Malissen M., Malissen B., Vincent-Lacaze N., Perez N., Udd B., Danos O. and Richard I.: Mannosidase I inhibition rescues the human  $\alpha$ -sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Human Molecular Genetics* 17: 1214–1221, 2008.

[9] Kobuke K., Piccolo F., Garringer K.W., Moore S.A., Sweezer E., Yang B. and Campbell K.P.: A common disease-associated missense mutation in alpha-sarcoglycan fails to cause muscular dystrophy in mice. *Human Molecular Genetics* 17: 1201–1213, 2008.

[10] Henriques S.F., Patissier C., Bourg N., Fecchio C., Sandonà D., Marsolier J. and Richard I.: Different outcome of sarcoglycan missense mutation between human and mouse. *PLOS ONE* 13: e0191274, 2018.

## Sarcoglycanopathie

Coordinator: Dorianna Sandona'

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

### **Telethon Project (nr):**

GGP15140

### **Disease Name:**

Sarcoglycanopathies (LGMD2D-F)

### **Keywords:**

folding defective protein, CFTR corrector, disease animal model

## Poster P.01.11

### SMN-PRIMED RIBOSOMES MODULATE THE TRANSLATION OF TRANSCRIPTS RELATED TO SPINAL MUSCULAR ATROPHY

Lauria F.<sup>[1]</sup>, Bernabò P.<sup>[1]</sup>, Tebaldi T.<sup>[2]</sup>, Groen E.<sup>[3]</sup>, Perenthaler E.<sup>[1]</sup>, Massimiliano C.<sup>[4]</sup>, Maniscalco F.<sup>[1]</sup>, Marchioretto M.<sup>[1]</sup>, Dalla Serra M.<sup>[1]</sup>, Inga A.<sup>[2]</sup>, Quattrone A.<sup>[2]</sup>, Gillingwater T.<sup>[3]</sup>, Viero G.<sup>\*[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Institute of Biophysics CNR ~ Trento ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Trento ~ Trento ~ Italy, <sup>[3]</sup>Edinburgh Medical School ~ Edinburgh ~ United Kingdom, <sup>[4]</sup>Immagina Biotech ~ Trento ~ Italy

Ribosome heterogeneity is coming of age as a sophisticated layer of control to shape cell proteomes. Despite major advances, the contribution of ribosome-associated factors to disease pathogenesis is still enigmatic. Here we show that the SMN protein, whose loss is the genetic cause of the motor neuron disease spinal muscular atrophy (SMA), binds to ribosomes and that this interaction varies among tissues. We show that SMN-specific ribosomes are positioned within the first five codons of a particular set of mRNAs. Loss of SMN at early stages of SMA induces translational defects in vivo characterized by depletion of ribosomes at the third and fifth codons. These positional defects cause ribosome drop-off from mRNAs bound by SMN-specialized ribosomes and, consequently, translational impairment of proteins involved in neuromuscular junction physiology. These results suggest that SMN plays a previously unnoticed yet crucial role as a modulator of ribosome function. Our work sheds new light on the involvement of specialized ribosomes in a devastating disease, establishing a new framework for general understanding of neurodegenerative diseases.

I ribosomi sono i macchinari cellulari deputati alla sintesi delle proteine. Recentemente si sta facendo strada l'ipotesi che i ribosomi siano eterogenei e che fattori proteici ad essi associati possano controllare in modi sofisticati e ancora poco noti la loro efficienza. In questo lavoro dimostriamo che la proteina Survival Motor Neuron (SMN), la cui perdita provoca l'atrofia muscolare spinale (SMA), si lega ai ribosomi e che questa interazione è tessuto-dipendente. I ribosomi associati a SMN sono preferenzialmente posizionati all'inizio della sequenza codificante di una popolazione ristretta di mRNA. Quando i livelli di SMN sono ridotti in seguito alla malattia, osserviamo importanti difetti nella corretta localizzazione dei ribosomi su questi trascritti e una conseguente perdita di produzione della proteina. Questi difetti posizionali causano il deterioramento nella funzione e nella stabilità dei motoneuroni.

None

Atrofia Muscolare Spinale

Coordinator: Gabriella Viero

Partner: Marina Boido

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19115

**Disease Name:**

Spinal Muscular Atrophy

**Keywords:**

SMA, translation, ribosome profiling

## Poster P.01.12

### A MITOCHONDRIAL THERAPY FOR MUSCULAR DYSTROPHIES

Bernardi P.\*

*Università di Padova ~ Padova ~ Italy*

Objective of this program is to target mitochondria to cure muscular dystrophies and to translate the advances we made in identifying novel inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore (PTP, a key effector of muscle cell death) into effective pharmacological treatments. Our hypothesis is that deregulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis—however caused—determines mitochondrial dysfunction due to Ca<sup>2+</sup> overload and oxidative stress. This abnormal situation is initially compensated but over time the adaptive mechanisms are overwhelmed, and onset of overt mitochondrial dysfunction due to PTP opening precipitates fiber death. The rationale is that contrasting PTP opening should defer if not prevent onset of muscle death and favor effective regeneration. Under Telethon support we have established that inhibition of cyclophilin (CyP) D counteracts PTP opening and prevents its detrimental consequences on muscle cell survival in vitro, and in in vivo models of muscular dystrophies. “Pure” CyP inhibitors like NIM811 and Alisporivir (Debio 025) are superior to cyclosporin A because at variance from the latter they do not inhibit calcineurin. The excellent safety profile of Alisporivir suggests that it should be used to treat Ullrich Congenital Muscular Dystrophy (UCMD), Bethlem Myopathy (BM) and Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). We will use muscle fibroblasts from UCMD, BM and DMD patients before and after differentiation into myotubes to assess whether treatment with Alisporivir and novel classes of PTP inhibitors (isoxazoles and benzamides) developed under an independent program are able to restore Ca<sup>2+</sup> homeostasis and prevent death. Compounds will also be tested for their protective effects in UCMD and DMD zebrafish models in vivo. In case a (pilot) trial with Alisporivir is started within the time frame of this program, we will monitor efficacy of patient treatment ex vivo by assessing mitochondrial function, incidence of apoptosis and muscle regeneration.

Una terapia mitocondriale per le distrofie muscolari

Introduzione. I mitocondri sono le centrali energetiche del nostro organismo, la sede della respirazione cellulare dove viene prodotta la maggior parte dell'ATP, la nostra "moneta" dell'energia. I mitocondri possiedono un canale (il poro di transizione della permeabilità, PTP) che, se si apre in modo inappropriato, causa un corto circuito energetico che compromette la contrattilità muscolare e può causare la morte precoce delle cellule, comprese le fibre muscolari. Questo canale viene attivato dallo stress ossidativo e dall'eccesso di calcio, che sono due dei fattori fondamentali implicati nella patologia delle fibre muscolari che può portare alla loro morte precoce.

Risultati. Abbiamo continuato a studiare gli effetti terapeutici di inibitori già noti del PTP derivati dalla ciclosporina A. A differenza della ciclosporina A questi farmaci (NIM811 e Alisporivir) sono privi di effetti immunosoppressori. Abbiamo anche sviluppato nuovi inibitori di diverse classi chimiche e studiato il loro effetto sulle cellule di pazienti affetti da distrofia del collagene VI e da distrofia di Duchenne e in modelli animali (topo e zebrafish) di queste malattie. Abbiamo chiarito in modo inequivocabile che Alisporivir e NIM811 sono molto più efficaci della ciclosporina perchè, a differenza di quest'ultima, non inibiscono la calcineurina e quindi non hanno gli effetti negativi che ha la

ciclosporina sulla rigenerazione muscolare.

Prospettive. Alisporivir è un farmaco ben tollerato e con un ottimo record di sicurezza. I nostri studi forniscono una solida base scientifica per il suo impiego nelle distrofie muscolari. Lo sviluppo di nuove molecole che hanno un effetto additivo con Alisporivir dovrebbe portare ad un aumento delle opzioni terapeutiche.

Zulian, A., Schiavone, M., Giorgio, V. and Bernardi, P. (2016) Forty years later: mitochondria as therapeutic targets in muscle diseases, *Pharmacol. Res.* 113, 563-573

Schiavone, M., Zulian, A., Menazza, S., Petronilli, V., Argenton, F., Merlini, L., Sabatelli, P. and Bernardi, P. (2017) Alisporivir rescues defective mitochondrial respiration in Duchenne muscular dystrophy, *Pharmacol. Res.* 125, 122-131

Carraro, M., Checchetto, V., Szabó, I. and Bernardi, P. (2019) F-ATP Synthase and the Permeability Transition Pore: Fewer doubts, more certainties, *FEBS Lett.* 593, 1542-1553

Šileikytė, J., Devereaux, J., de Jong, J., Schiavone, M., Jones, K., Nilsen, A., Bernardi, P., Forte M.A. and Cohen, M. (2019) Second generation inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore with improved plasma stability, *ChemMedChem*, in press

Distrofia di Ullrich; Distrofia di Duchenne

Coordinator: Paolo Bernardi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17092

**Disease Name:**

Ullrich Congenital MD; Duchenne MD

**Keywords:**

Muscular Dystrophy, Mitochondria, Permeability Transition

## Poster P.01.13

### SPERMIDINE AS NEW CANDIDATE FOR THE TREATMENT OF COL6 MYOPATHIES (SPECTRE-COL6)

Castagnaro S.\*<sup>[1]</sup>, Gambarotto L.<sup>[1]</sup>, Metti S.<sup>[1]</sup>, Da Ros F.<sup>[1]</sup>, Sabatelli P.<sup>[3]</sup>, Basso D.<sup>[2]</sup>, Bonaldo P.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Padova, Dept. of Molecular Medicine ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>University Hospital Padova, Dept. of Medicine ~ Padova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Rizzoli Hospital, IGM-CNR, Laboratory of Molecular Genetics ~ Bologna ~ Italy

Broad objectives and specific aims.

Our focus is laying the foundations for prospective clinical trials in patients affected by Collagen VI (COL6)-related myopathies, namely Ullrich Congenital Muscular Dystrophy (UCMD) and Bethlem Myopathy (BM) (1). This translational project is aimed at: i) elucidating in detail the effects of a non-toxic nutraceutical agent, using the most promising molecule we identified for therapeutic approaches in BM and UCMD, namely spermidine (Spd); ii) establishing novel non-invasive biomarkers and previously undescribed preclinical outcome measures for COL6-related myopathies, in collaboration with Prof. Daniela Basso (Dept. of Medicine, University Hospital Padova).

Background/Rationale.

We previously demonstrated that Spd is capable to rescue the myopathic phenotype of COL6 null mice by reactivating autophagy (2,3), the pro-survival pathway we found to be deregulated in both mutant mice and BM/UCMD patients (4). A pilot clinical trial by low-protein diet in BM/UCMD patients showed the efficacy of this approach in modulating autophagy and counteracting disease progression (5), pointing at autophagy as a valuable therapeutic target. As a non-toxic natural compound promoting autophagy, Spd represents an excellent choice for therapy.

Research design and methods for achieving the stated objectives.

We will characterize autophagic defects of patient-derived primary myoblasts and fibroblasts, obtained from our international clinical collaborators. Further, we will validate Spd efficacy on patient-derived in vitro myoblasts and fibroblasts. Finally, we will assess the use of blood-derived leukocytes and exosomes as non-invasive biomarkers for monitoring Spd in vivo effects. For the completion of these tasks, we will collaborate with the experienced clinical research team of Prof. Basso, who will perform proteomic assays on cell- and blood-derived exosomes and will design standard operating procedures for biomaterial handling.

Anticipated output.

The achievement of our goals will provide key information and new standardized procedures, paving the way for Spd use in clinical settings. Validation of the identified Spd molecular targets using BM/UCMD in vitro models will allow establish its efficacy and safety. Moreover, the identification of novel non-invasive biomarkers for diagnostic purposes and for the evaluation of Spd effects will be of great help for future clinical studies and trials in these rare diseases.

Dal laboratorio alla clinica: la spermidina come nuovo candidato per il trattamento delle miopatie da deficit di COL6.

Il nostro gruppo studia da anni le malattie muscolari da carenza di collagene VI (COL6), le cui forme



principali sono la distrofia congenita di Ullrich e la miopatia di Bethlem (1,3). I nostri studi precedenti avevano contribuito a chiarire i meccanismi patologici che le caratterizzano e a identificare possibili terapie in grado di migliorarne i sintomi ed i difetti muscolari (2-5). Ora, ci proponiamo di valutare le potenzialità di una molecola chiamata spermidina, solubile in acqua e presente in numerose sostanze naturali, che in studi recenti abbiamo dimostrato essere in grado di attivare una risposta cellulare nota come autofagia (2). L'autofagia rappresenta la "via di smaltimento rifiuti" della cellula: se non funziona bene, i rifiuti si accumulano e creano danni (6). Proprio l'autofagia è alterata nei pazienti Ullrich e Bethlem e nel modello murino privo di COL6, e la sua riattivazione risulta benefica e migliora lo stato del muscolo ammalato (4).

Questo progetto mira a testare l'efficacia della spermidina in cellule dei pazienti Ullrich e Bethlem e nei topi privi di COL6. In particolare: (a) verranno caratterizzati i difetti di autofagia nelle cellule umane prive di COL6 ottenute da pelle e da muscolo; (b) verrà fornita la spermidina ai topi nell'acqua da bere, per testare la sua capacità di recuperare il calo di forza muscolare osservato in assenza di COL6; (c) si indagherà quali parametri biologici siano misurabili nel sangue e nelle cellule ottenute sia da questi animali, sia dai pazienti Ullrich e Bethlem, in risposta ai trattamenti con spermidina.

I risultati di questo studio potranno le basi necessarie per poter progettare nuovi trial clinici a favore dei pazienti affetti da miopatie con deficit di COL6, che prevedano l'utilizzo di un nutraceutico facilmente assumibile e potenzialmente privo di effetti collaterali sgraditi. Inoltre, al fine di aumentare il benessere dei pazienti, cercheremo di individuare nuovi strumenti per il monitoraggio delle risposte terapeutiche che riducano il ricorso ad interventi invasivi quali i prelievi di biopsie muscolari (ad esempio, tramite analisi del sangue o piccoli prelievi di pelle).

(1) Cescon et al., J Cell Sci 2015

(2) Chrisam et al., Autophagy 2015

(3) Bonaldo et al., Hum Mol Genet 1998

(4) Grumati et al., Nat Med 2010

(5) Castagnaro et al., Autophagy 2016

(6) Levine and Kroemer, Cell 2019

Distrofia Muscolare Congenita di Ullrich; Miopatia di Bethlem

Coordinator: Paolo Bonaldo

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2020

**Telethon Project (nr):**

GGP19229

**Disease Name:**

Ullrich Muscular Dystrophy; Bethlem Myopathy

**Keywords:**

Collagen VI disorders, Spermidine, Biomarkers

## **02\_Genetic muscular disease\Myopathies and cardiomyopathies**

## Poster P.02.14

### REMODELING OF MITOCHONDRIAL FUNCTION AND GENE EXPRESSION IN CORE MYOPATHY PATIENTS

Suman M.\*<sup>[1]</sup>, Menegollo M.<sup>[1]</sup>, Muntoni F.<sup>[2]</sup>, Duchen M.<sup>[3]</sup>, Pegoraro E.<sup>[4]</sup>, Szabadkai G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Padua, 35131 Padua, Italy ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute of Child Health, University College London ~ London ~ United Kingdom, <sup>[3]</sup>University College London, Department of Cell and Developmental Biology ~ London ~ United Kingdom, <sup>[4]</sup>Neuromuscular Unit, Department of Neuroscience, University of Padua ~ Padova ~ Italy

Core myopathies are a group of muscle disorders caused by mutations of the ryanodine receptor (RyR1), the Ca<sup>2+</sup> release channel of the sarcoplasmic reticulum. These mutations have previously been associated with elevated inositol trisphosphate receptor (IP3R) levels in skeletal muscle myotubes derived from patients. However, the functional relevance and the relationship of IP3R-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling with the pathophysiology of the disease is unclear. It has also been suggested that mitochondrial dysfunction underlies the development of central and diffuse multi-mini-cores, devoid of mitochondrial activity, which is a key pathological consequence of RyR1 mutations. Here we used muscle biopsies of central core and multi-mini-cores disease patients with RyR1 mutations, as well as cellular and in vivo mouse models of the disease to characterize global cellular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signalling, mitochondrial function and gene expression associated with the disease. We show that remodelling of Ca<sup>2+</sup> signalling in response to RyR1 loss or dysfunction causes in patient myotubes compensatory upregulation of IP3Rs, which increases IP3 mediated signalling in the mitochondria and nuclear compartment. Moreover RyR1 loss of function induced by siRNA transfection in C2C12 mouse myotubes increases IP3R expression level, cytosolic and nuclear IP3-mediated Ca<sup>2+</sup> responses and ATP-induced Ca<sup>2+</sup> uptake in mitochondria. IP3R mediated altered Ca<sup>2+</sup> signalling activates mitochondrial biogenesis in both patient and siRNA transfected C2C12 mouse myotubes at protein expression levels and this was reflected in increased mitochondrial DNA content in human biopsies. Finally, RyR1 loss or dysfunction leads in both human and mouse muscle tissues large-scale rearrangement of muscle gene expression, which involves both Ca<sup>2+</sup> signalling pathways and mitochondrial biogenesis. Altogether, these data indicate that remodelling of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> signalling following loss of functional RyR1 mediates bioenergetic adaptation (Suman et al., 2018). Further analysis of human samples suggest that the reciprocal regulation of RyR1 and IP3Rs is a wide-ranging phenomenon in core myopathy patients and associates with remodelling of mitochondrial biogenesis, confirming the potential clinical relevance of the data.

Rimodellamento della espressione genica e funzione mitocondriale nelle malattie 'central core' del muscolo scheletrico

La quantità di ioni calcio all'interno della fibra muscolare controlla la forza e la tempistica ottimale della contrazione del muscolo scheletrico. Pertanto, difetti genetici delle molecole che regolano il movimento di questi ioni, i canali ionici, portano alla perdita della funzione e della forza muscolare, sintomi principali di malattie chiamate miopatie. Noi studieremo i meccanismi patologici di base di due particolari miopatie, causate da mutazioni in due geni. Nella miopia congenita central core, caratterizzata da debolezza muscolare del tronco, un canale chiamato Recettore della Rianodina è difettoso. L'altra patologia che studieremo è caratterizzata dalla mancanza di una proteina, chiamata MICU1, che regola l'apertura di un canale, causando difetti al sistema nervoso che portano ad un

alterato controllo dei movimenti volontari (chiamata miopatia con segni extrapiramidali). Un importante indizio per capire come queste mutazioni causino queste patologie viene da nostre osservazioni che dimostrano come in entrambi i casi l'organello che è la maggiore sorgente di energia per il movimento muscolare, chiamato mitocondrio, risulta difettoso. Infatti, la mancanza di una sorgente energetica corretta porta a ridotta forza muscolare, dolore ed eventualmente danno muscolare, accompagnato infine dalla morte delle cellule nervose.

Il nostro principale obiettivo è di capire i meccanismi attraverso cui difetti negli organelli che producono energia causino un alterato movimento di calcio nella fibra muscolare. Se capiremo questi meccanismi saremo in grado di applicare trattamenti farmacologici o modificazioni genetiche per combattere queste patologie.

Nel lavoro sperimentale utilizzeremo una grande quantità di risorse disponibili nel nostro laboratorio per applicare tecniche avanzate. Questo ci permetterà di studiare una grande gamma di aspetti della malattia, dal meccanismo attraverso cui le cellule si adattano al danno a come degenerano e muoiono. Per condurre i nostri esperimenti useremo sia animali geneticamente modificati sia modelli derivanti da cellule di pazienti su cui applicheremo tecniche di microscopia e biochimica.

Lo studio di questi meccanismi patologici ci aiuterà ad applicare e testare possibili farmaci e i loro bersagli per migliorare e possibilmente curare queste malattie.

1. Suman M, Sharpe JA, Bentham RB, et al. Inositol Trisphosphate Receptor Mediated Ca<sup>2+</sup> Signalling Stimulates Mitochondrial Function and Gene Expression in Core Myopathy Patients. Hum Mol Genet. 2018;0(0):1-16. doi:10.1093/hmg/ddy149

Miopatia congenita central core

Coordinator: Gyorgy Szabadkai

Partner: Anna Raffaello

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16026

**Disease Name:**

Central Core Disease

**Keywords:**

skeletal muscle, mitochondria, calcium

## Poster P.02.15

### A NOVEL IN VITRO DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY CARDIOMYOPATHY MODEL: HUMAN IPSC-DERIVED CARDIOMYOCYTES FOR MECHANISTIC STUDIES

**Pioner J.M.\*<sup>[1]</sup>**, Santini L.<sup>[2]</sup>, Palandri C.<sup>[2]</sup>, Martella D.<sup>[3]</sup>, Lupi F.<sup>[3]</sup>, Langione M.<sup>[1]</sup>, Querceto S.<sup>[1]</sup>, Grandinetti B.<sup>[3]</sup>, Balducci V.<sup>[2]</sup>, Mazzantini C.<sup>[1]</sup>, Donati M.A.<sup>[4]</sup>, Sartiani L.<sup>[2]</sup>, Tesi C.<sup>[1]</sup>, Cerbai E.<sup>[2]</sup>, Poggese C.<sup>[1]</sup>, Parmeggiani C.<sup>[3]</sup>, Coppini R.<sup>[2]</sup>, Sacconi L.<sup>[3]</sup>, Ferrantini C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Div. di Scienze Fisiologiche, Università degli studi di Firenze ~ Firenze ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dipartimento di NeuroFarBa, Università degli studi di Firenze, ~ Firenze ~ Italy, <sup>[3]</sup>European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy ~ Sesto Fiorentino ~ Italy, <sup>[4]</sup>Metabolic and Neuromuscular Unit, AOU Meyer Hospital ~ Firenze ~ Italy

A severe cardiomyopathy invariably affects patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD), but the onset and molecular sequelae resulting from dystrophin deficiency in DMD heart tissue are poorly understood. For modelling the earliest phase of DMD cardiomyopathy, we studied human cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (hiPSC-CMs) obtained from urine or blood of DMD patients. We investigated the contractile function and calcium handling of hiPSC-CMs on custom made biomimetic substrates with micropatterned topography and tunable stiffness to mimic the interplay between the extracellular matrix and individual cardiomyocytes in the absence of full-length dystrophin.

Action potential and calcium transient of control-, patient-specific and isogenic control hiPSC-CMs were simultaneously analyzed by fluorescent indicators. Contractile properties of cell and isolated myofibrils were explored.

A DMD-patient cell line with no detectable dystrophin (DMD-CMs; Δexon 50) were compared to one pair of

isogenic hiPSC-CMs from a healthy control and the CRISPR-Cas9-genome edited with lack of full-length dystrophin (DMD-c.Δ263G-CMs). Our results demonstrated that lack of dystrophin results in reduced myofibril tension and slower relaxation kinetics due to both Ca<sup>2+</sup> handling abnormalities and myofibril properties. This study offers new insights into the functional consequences of dystrophin deficiency at an early stage of cardiomyocyte development in both patient derived-and isogenic-hiPSC-CM models of DMD cardiomyopathy. Our DMD-hiPSC models support the hypothesis that the absence of full-length dystrophin is sufficient to perturb cardiomyocyte function without the effect of the progressive systemic alteration as previously proposed.

Un nuovo modello in vitro, basato su cardiomiociti derivati da cellule ips, per studiare i meccanismi della cardiomiopatia associata alla distrofia muscolare

Pazienti con Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) sviluppano inevitabilmente un progressiva disfunzione del muscolo cardiaco responsabile di scompenso cardiaco. Tuttavia, ancora poco è noto sulle conseguenze primarie o secondarie funzionali e molecolari della deficienza di distrofina che portano a questa cardiomiopatia. Come modello delle fasi più precoci dello sviluppo della DMD nel cuore, abbiamo studiato cardiomiociti differenziati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-CM) generati da cellule nucleate ottenute da urina o sangue di pazienti DMD. Abbiamo quindi studiato la funzione contrattile e la regolazione del calcio di iPSC-CM che grazie ad un processo di maturazione (80-100 giorni) su substrati di coltura che mimano la morfologia e la rigidità della matrice extracellulare. Abbiamo confrontato le caratteristiche funzionali di una linea cellulare da paziente DMD

portatore della Delezione dell'esone 50 con quelle ottenute da una coppia di controlli isogenici ottenute da soggetto sano con normale distribuzione della distrofina (CTRL-CM) e il suo corrispettivo con modificazione genica con la tecnica CRISPR-Cas9 in cui è stata inserita una mutazione puntiforme nell'esone 1 del gene DMD che ha comportato la mancanza della isoforma lunga di distrofina (Dp427). I nostri risultati hanno mostrato che la mancanza di distrofina è associata ad una ridotta forza contrattile esercitata dalle miofibrille a cui si associa un prolungamento della cinetica di rilasciamento del cardiomiocita dovuta sia all' alterata funzione miofibrillare che ad anomalie dell'omeostasi del calcio intracellulare. Questo studio offre nuove prospettive sulle conseguenze della mancanza di distrofina nelle fasi precoci dello sviluppo della cardiomiopatia associata a DMD. I dati ottenuti dalle linee iPSC da pazienti DMD suggeriscono che la mancanza della forma intera di distrofina è sufficiente ad alterare le caratteristiche contrattili di cardiomiociti cresciuti in assenza di altri degenerazioni sistemiche che ne possono compromettere, in maniera secondaria, la funzione.

Pioner JM. et al., Absence of full-length dystrophin impairs normal maturation and contraction of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells, *Cardiovasc Res*, 2019

Distrofia Muscolare di Duchenne

Coordinator: Cecilia Ferrantini

Partner Leonardo Sacconi

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GGP16191

**Disease Name:**

Duchenne Muscular Dystrophy

**Keywords:**

Duchenne Muscular Dystrophy, dystrophin, cardiomyopathy

## Poster P.02.16

### DEVELOPING TOOLS FOR TRIAL READINESS IN PRIMARY MITOCHONDRIAL MYOPATHIES OF THE ADULTHOOD

Siciliano G.\*<sup>[1]</sup>, Montano V.<sup>[1]</sup>, Ricci G.<sup>[2]</sup>, Mancuso M.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Neurological Institute, Dept of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa ~ PISA ~ Italy, <sup>[2]</sup>~ Italy

In recent years, there has been a surge of interest in mitochondrial diseases (MD). However, the treatment of MD is still inadequate, despite great progress in knowledge of pathophysiology and molecular genetics. There have been very few randomized controlled clinical trials for the treatment of MD. Those that have been performed were short, and involved fewer than twenty study participants with heterogeneous phenotypes.

Small patient populations represent the major impediment to progress in research and care. A patient register, in combination with a biomaterial bank, can overcome this limitation. Granted by Telethon-UILMD in 2009 (GUP09004), the nation-wide Italian collaborative network has been established, and it has already developed a web-based registry of patients with MD. We have collected 1700 patients, with onset of the disease in both adulthood and in childhood. Besides a low prevalence there are other major limitations specific of MD. These include the lack of shared outcome measures, of useful biomarkers and the incomplete understanding of the natural history, limiting the correct interpretation, reproducibility and comparability of clinical trials in patients with MD. New therapeutic strategies have recently been emerging, some of which have shown potential efficacy at the pre-clinical level. Therefore, the establishment of means for “clinical readiness” for the development of forthcoming clinical trials is strongly needed. For these reason, aims of this project are:

- Focus our efforts on primary mitochondrial myopathies with adulthood (>16-yr of age)

onset

- Development and validation of shared functional outcome measures

- Evaluation of new promising biomarkers, in particular FGF-21 and GDF-15.

- Characterization of the natural history of PMM

These steps, fundamental to monitor in vivo the evolution of the disease and finally to have a good toolkit for future clinical trials in MD.

Sviluppo dei necessari strumenti per “essere pronti” a trial clinici nelle miopatie mitocondriali dell’adulto.

Le malattie mitocondriali (MM) sono patologie con un difetto della catena respiratoria mitocondriale e disfunzione di numerosi organi e apparati, tra cui sistema nervoso centrale, muscolo e cuore. Malgrado i progressi registrati negli ultimi anni nella comprensione dei meccanismi molecolari, le scelte terapeutiche sono limitate e spesso sintomatiche, in grado cioè di mitigare i sintomi ma di non risolvere i meccanismi di base della malattia. A rendere ancora più difficile questo settore è che in genere i centri clinici e gli studi contano su pochi casi, il che costituisce un impedimento nel progresso dell’assistenza medica e delle prospettive terapeutiche. Questo limite può essere superato creando registri di pazienti. Nel 2009, grazie anche al supporto di Telethon UILDM (GUP09004) abbiamo costituito il network Italiano di centri clinici mitocondriali. Tale network ha già raggiunto importanti risultati, tra cui la creazione del registro nazionale delle MM sul web, con reclutamento di circa 1700 pazienti. Oltre ai piccoli numeri, altre limitazioni sono più specifiche delle MM, es. mancanza di misure

condivise per valutare la risposta alle terapie (“outcome”), di biomarcatori utili e l’incompleta comprensione della storia naturale. Ciò limita la corretta interpretazione, riproducibilità e comparabilità degli studi clinici nelle MM. Dagli studi pre-clinici stanno emergendo nuove potenziali strategie terapeutiche, che obbligano i clinici ad essere maggiormente pronti a prossimi studi clinici. Pertanto, obiettivi di questo progetto sono:

- sviluppo di scale funzionali condivise, per i pazienti con miopatia mitocondriale (quali la oftalmoplegia esterna progressiva -PEO- e altre forme miopatiche) con età di esordio in età adulta (oltre i 16 anni di età).

- studio di due biomarcatori di malattia mitocondriale (FGF-21 e GDF-15) per valutarne la sensibilità nelle miopatie mitocondriali.

- caratterizzazione della storia naturale delle miopatie mitocondriali

Questi punti sono fondamentali per monitorare in vivo l’evoluzione della malattia e, finalmente, avere un buon armamentario per gli studi clinici.

-Mancuso M, McFarland R, Klopstock T, Hirano M; consortium on Trial Readiness in Mitochondrial Myopathies. International Workshop: Outcome measures and clinical trial readiness in primary mitochondrial myopathies in children and adults. Consensus recommendations. 16-18 November 2016, Rome, Italy. *Neuromuscul Disord*. 2017

- DiMauro S. (2011) A history of mitochondrial diseases *Inherit Metab Dis* 34:261–276

- DiMauro S, Hirano M, Kaufmann P, et al (2002) Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. *Adv Neurol* 89:217-229.

- DiMauro S, Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668.

- DiMauro S, Tay S, Mancuso M (2004) Mitochondrial encephalomyopathies: diagnostic approach. *Ann N Y Acad Sci* 1011:217-231.

- Elson JL, Cadogan M, Apabhai S, et al (2013) Initial development and validation of a mitochondrial disease quality of life scale. *Neuromuscul Disord* 23:324-329.

- Filosto M, Mancuso M (2007) Mitochondrial diseases: a nosological update. *Acta Neurol Scand* 115:211-221.

- Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, et al (2014) The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? *J Neurol* 261:504-510.

- Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, et al (2015) Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. *J Neurol* 262:1301-1309.

- Mancuso M, Orsucci D, Angelini CI, et al (2013) Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA “MERRF” mutation. *Neurology*.

- Mancuso M, Orsucci D, Coppede F, et al (2009) Diagnostic approach to mitochondrial disorders: the need for a reliable biomarker. *Curr Mol Med* 9:1095-1107.

- Mancuso M, Orsucci D, Logerfo A, et al (2010) Oxidative stress biomarkers in mitochondrial myopathies, basally and after cysteine donor supplementation. *J Neurol* 257:774-781.

## Miopatie Mitocondriali

Coordinator: Michelangelo Mancuso

Partners: Costanza Lamperti, Giacomo Pietro Comi, Tiziana Enrica Mongini, Paola Tonin, Valerio Carelli, Serenella Servidei, Olimpia Musumeci, Massimiliano Filosto, Elena Pegoraro



Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GSP16001

**Disease Name:**

Mitochondrial Myopathies

**Keywords:**

mitochondrial diseases, myopathies, CLINICAL TRIALS READINESS

## Poster P.02.17

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

Tavian D.<sup>\*[3]</sup>, Pennisi E.M.<sup>[1]</sup>, Musarò A.<sup>[2]</sup>, Arca M.<sup>[2]</sup>, Angelini C.<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>San Filippo Neri Hospital ~ Roma ~ Italy, <sup>[2]</sup>Sapienza Università di Roma ~ Roma ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università Cattolica ~ Milano ~ Italy, <sup>[4]</sup>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,  $\alpha$ -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 NLSM si suddividono in NLSM-M, principalmente con interessamento muscolare, e NLSM-I, con ittiiosi. 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

NLSDM. 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

## Poster P.02.18

### STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY (SOCE): ROLE IN SKELETAL MUSCLE FUNCTION AND DISEASE.

Protasi F.<sup>[1]</sup>, Sorrentino V.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Univ. G. d'Annunzio Chieti-Pescara ~ Chieti ~ Italy, <sup>[2]</sup>Università degli Studi di Siena ~ Siena ~ Italy

Background and Rationale. Store operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) is a Ca<sup>2+</sup> entry mechanism, first described in non-excitable cells, that is triggered by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores (endoplasmic and sarcoplasmic reticulum, ER and SR) (1, 2). SOCE mediates recover of extracellular Ca<sup>2+</sup> through STIM1 and Orai1 interaction (3, 4), and is modulated in muscle by Calsequestrin-1 (CASQ1) (5). Mutations in STIM1, Orai1, and CASQ1 have been linked to tubular aggregate myopathy (TAM) (6-8), a myopathy characterized by muscle pain, cramping, weakness, and presence of tubular aggregates (TAs)(9, 10). The mechanisms linking human mutations to SOCE dysfunction, dysregulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis, and finally to development of TAM are still unknown.

Broad Objective: understand the pathophysiology of TAM, a rare disease linked to mutations in STIM1, Orai1, and CASQ1 (all proteins involved in SOCE).

Specific Aims: 1) investigate the molecular mechanisms that allow dynamic assembly of STIM1 and Orai1 in SOCE-sites; 2) understand how STIM1, Orai1, and CASQ1 accumulation in TAs leads to unbalanced Ca<sup>2+</sup> homeostasis and muscle weakness/fatigue; 3) study the pathophysiology of TAM in two newly generated knock-in mice carrying human TAM mutations; 4) express CASQ1-mutants linked to TAM in muscle cells and fibers to assess their effect on intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress.

Research Design and Methods. We will combine a) highly complementary structural, molecular, cellular, and functional experimental approaches used in the laboratories and b) newly generated knock-in mice carrying TAM mutations (Orai1-G98S and CASQ1-D44N) to test the hypothesis that accrual of TAs in diseased muscle: i) is caused by altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis that leads to ER stress and ii) is a primary cause of dysfunction and disease.

Preliminary Results. We have already collected the following sets of data: a) transverse tubule (TT) plasticity drives the assembly of SOCE.sites in muscle during exercise: b) in muscles containing TAs (which stain positive for both STIM1 and Orai1) extracellular Ca<sup>2+</sup> does not contributes to normal contractility; c) Orai1-G98S human mutation in knock-in mice results in formation of TAs and dysfunctional SOCE; d) mutations in CASQ1 alter Ca<sup>2+</sup> homeostasis and induce ER stress response.

Anticipated Output. A deeper understanding of the molecular mechanisms that cause dysfunctional interaction between STIM1-Orai1-CASQ1 and formation of TAs could provide the basis for future development of therapeutic interventions targeted to normalize altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis in various human myopathies (including TAM).

Titolo:

Ingresso di Calcio operato dagli stores intracellulari (o SOCE): ruolo nella funzione e nella malattia del muscolo scheletrico.

Store operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) è un meccanismo per l'ingresso del Ca<sup>2+</sup>, descritto per la prima volta in cellule non eccitabili, innescato dall'esaurimento di Ca<sup>2+</sup> nei depositi intracellulari (Reticolo Endoplasmatico e Sarcoplasmatico). SOCE opera il recupero di Ca<sup>2+</sup> extracellulare attraverso

l'interazione fra STIM1 ed Orai1 (3,4), ed è modulato nel muscolo dalla Calsequestrina-1 (CASQ1). Mutazioni in STIM1, Orai1, e CASQ1 sono state identificate in pazienti affetti da Miopatia degli Aggregati Tubulari (o TAM), una malattia che causa dolore muscolare, crampi, debolezza e porta in alcune persone a deformità articolari in braccia e gambe. La TAM è caratterizzata dalla presenza di aggregati tubulari (TAs), strutture anomale che rappresentano un raro, ma importante, indicatore di varie miopatie umane. I meccanismi che collegano le mutazioni nei geni sopra menzionati alla disfunzione di SOCE, alla de-regolazione dell'omeostasi del Ca<sup>2+</sup>, ed infine allo sviluppo della TAM sono ancora sconosciuti.

L'incidenza di TAM nella popolazione è ancora sconosciuta e non è ancora disponibile alcuna cura per i pazienti. L'obiettivo principale di questo progetto è aumentare le conoscenze attuali della fisiopatologia della TAM.

Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo ora generato i primi modelli murini al mondo che presentano mutazioni umane in Orai1-G98S e in CASQ1-D44N legate a TAM. I modelli murini sono essenziali per lo studio delle patologie e per il possibile sviluppo di farmaci.

Abbiamo già collezionato Risultati Preliminari che rendono il topo Orai1-G98S un buon modello animale per lo studio della TAM.

Il lavoro proposto in questo progetto ha il potenziale di a) migliorare le nostre conoscenze dei meccanismi che portano mutazioni umane alla formazione dei TAs nel muscolo e b) fornire le basi per il futuro sviluppo di interventi terapeutici.

Questo progetto si adatta alla missione Telethon ONLUS in quanto: i) potrebbe diventare rilevante per la cura di varie malattie di comprovata origine genetica che attualmente non hanno cura; e ii) potrebbe potenzialmente identificare nuovi targets terapeutici per lo sviluppo di strategie finalizzate a migliorare la funzione muscolare, limitare la fatica muscolare, debolezza, e a disfunzione in varie miopatie umane causate dall'alterazione dell'omeostasi del Ca<sup>2+</sup> (inclusa la TAM).

1. Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 1986; 7(1):1-12.
2. Parekh AB and Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*. 1997; 77(4):901-930.
3. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr. and Meyer T. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup> store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol*. 2005; 15(13):1235-1241.
4. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R and Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science*. 2006; 312(5777):1220-1223.
5. Shin DW, Pan Z, Kim EK, Lee JM, Bhat MB, Parness J, Kim DH and Ma J. A retrograde signal from calsequestrin for the regulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2003; 278(5):3286-92.
6. Böhm J, Chevessier F, Koch C, Peche GA, Mora M, Morandi L, Pasanisi B, Moroni I, Tasca G, Fattori F, Ricci E, Péniisson-Besnier I, Nadaj-Pakleza A, Fardeau M, Joshi PR, Deschauer M, Romero NB, Eymard B and Laporte J. Clinical, histological and genetic characterisation of patients with tubular aggregate myopathy caused by mutations in STIM1. *J Med Genet*. 2014; 51(12):824-833.
7. Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Matsumoto N, Nonaka I and Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(3):637-648.
8. Barone V, Del Re V, Gamberucci A, Polverino V, Galli L, Rossi D, Costanzi E, Toniolo L, Berti G, Malandrini A, Ricci G, Siciliano G, Vattemi G, Tomelleri G, Pierantozzi E, Spinozzi S, Volpi N, Fulceri R, Battistutta R, Reggiani C and Sorrentino V. Identification and characterization of three novel mutations in the CASQ1 gene in four patients with tubular aggregate myopathy. *Hum Mutat*. 2017;

38(12):1761-1773.

9. Jain D, Sharma MC, Sarkar C, Suri V, Sharma SK, Singh S and Das TK. Tubular aggregate myopathy: a rare form of myopathy. J Clin Neurosci. 2008; 15(11):1222-1226.

10. Pierobon-Bormioli S, Armani M, Ringel SP, Angelini C, Vergani L, Betto R and Salviati G. Familial neuromuscular disease with tubular aggregates. Muscle Nerve. 1985; 8(4):291-298.

Miopatìa degli Aggregati Tubulari

Coordinator: Feliciano Protasi

Partner: Vincenzo Sorrentino

Duration (N. Years): 3

Starting date: October 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19231

**Disease Name:**

Tubular Aggregate Myopathy

**Keywords:**

Skeletal Muscle, Tubular Aggregate Myopathy (TAM), Store Operated Calcium Entry (TAM)

## 03\_Genetic muscular disease\Myotonic disorders



## Poster P.03.19

### SKELETAL MUSCLE AND CIRCULATING MICRORNAS IN MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1

Perfetti A.<sup>[1]</sup>, Cardinali B.<sup>[2]</sup>, Cappella M.<sup>[2]</sup>, Fuschi P.<sup>[1]</sup>, Provenzano C.<sup>[2]</sup>, Voellenkle C.<sup>[1]</sup>, Cardani R.<sup>[1]</sup>, Garcia-Manteiga J.M.<sup>[3]</sup>, Meola G.<sup>[1]</sup>, Falcone G.<sup>[2]</sup>, Martelli F.<sup>\*(1)</sup>

<sup>[1]</sup>IRCCS-Policlinico San Donato ~ San Donato Milanese ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute of Cell Biology and Neurobiology, National Research Council ~ Monterotondo, Roma ~ Italy, <sup>[3]</sup>IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a complex disease caused by the expansion of a (CTG)<sub>n</sub> repeat in the 3'UTR of the DMPK gene. This genetic lesion causes the accumulation of the mutated transcripts into nuclear RNA foci that trigger a toxic gain of function, including alteration of microRNA (miRNA) expression and intracellular localization.

The first aim of this project was to define the physio-pathogenetic role of miRNA dysregulation in DM1 by a comprehensive characterization of the RNAs present in the miRNA effector complex (RISC). We analyzed by RNA-sequencing the RISC-associated RNAs in skeletal muscle biopsies derived from DM1 patients and matched controls. The miRNA/mRNAs found deregulated in DM1 biopsies were involved in pathways and functions relevant for the disease, such as energetic metabolism, calcium signaling, muscle contraction and p53-dependent apoptosis. Bioinformatics analysis of the miRNA/mRNA interactions based on the RISC enrichment profiles, identified 24 miRNA/mRNA correlations. Following validation in 21 independent samples, we focused on the couple miR-29c/ASB2 because of the role of miR-29c in fibrosis (a feature of late-stage DM1 patients) and of ASB2 in the regulation of muscle mass. Luciferase reporter assays confirmed the direct interaction between miR-29c and ASB2. Moreover, decreased miR-29c and increased ASB2 levels were verified also in immortalized myogenic cells and primary fibroblasts, derived from biopsies of DM1 patients and controls. CRISPR/Cas9-mediated deletion of CTG expansions rescued normal miR-29c and ASB2 levels, indicating a direct link between the mutant repeats and the miRNA/target expression. In conclusion, functionally relevant miRNA/mRNA interactions were identified in skeletal muscles of DM1 patients, highlighting the dysfunction of miR-29c and ASB2.

The second aim of this project was the identification of a DM1-specific miRNA signature in the peripheral blood to use as disease biomarker.

Preliminary studies identified a subset of miRNAs that are deregulated in the plasma or serum of small groups of DM1 patients. Here we adopted very stringent selection and normalization criteria to validate or disprove these miRNAs in 103 DM1 patients and 111 matched controls. We confirmed that 8 miRNAs out of 12 were significantly deregulated in DM1 patients: miR-1, miR-27b, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-140-3p, miR-454 and miR-574. The levels of these miRNAs, alone or in combination, discriminated DM1 from controls significantly, and correlated with both skeletal muscle strength and creatine kinase values. Finally, the identified miRNAs were also deregulated in the plasma of a small group (n = 30) of DM2 patients. In conclusion, this study proposes that miRNAs might be used as DM1 humoral biomarkers.

In line with the results obtained with miRNAs, in parallel we also identified circular RNAs dysregulation in skeletal muscles of DM1 patients, highlighting the important role of noncoding RNAs in DM1.

MicroRNA del muscolo scheletrico e circolanti nella distrofia miotonica di tipo 1

La distrofia miotonica di tipo 1 (DM1) è una malattia che coinvolge il muscolo scheletrico, ma anche gli

occhi, il cuore, il sistema endocrino e il sistema nervoso centrale. Le forme più gravi sono caratterizzate da ipotonia e debolezza generalizzata alla nascita, spesso accompagnata da insufficienza respiratoria e morte precoce. La DM1 è causata dalla presenza di triplette di CTG ripetute fino a migliaia di volte nella sequenza di DNA del gene DMPK. Questa mutazione provoca l'accumulo degli RNA messaggeri del gene DMPK in aree nucleari chiamate foci e, come conseguenza, un effetto tossico sulle funzioni cellulari, incluse alterazioni della maturazione di altri RNA messaggeri e della funzione di piccoli RNA regolativi chiamati microRNA. Sebbene studi precedenti abbiano evidenziato alterazioni di alcuni microRNA nei pazienti affetti da distrofia miotonica, le conseguenze funzionali sullo sviluppo della malattia sono ancora poco conosciute e sono state oggetto di questo progetto di ricerca.

Le attività pianificate sono state condotte con successo e i risultati ottenuti dimostrano un ruolo critico dei microRNA nei meccanismi molecolari alla base della DM1. I nostri studi hanno messo in evidenza i microRNA che sono funzionalmente alterati nei tessuti dei malati di DM1 e hanno permesso di identificare combinazioni di microRNA e loro RNA messaggeri bersaglio rilevanti per la malattia.

Inoltre, questi studi hanno confermato l'esistenza di un'alterazione della frazione dei microRNA presenti nel sangue periferico dei pazienti affetti da DM1 e hanno portato all'identificazione di un gruppo di microRNA utilizzabili come biomarcatori della malattia, che consentono cioè di valutare la progressione della malattia.

Infine, sono state poste le basi per due altri studi, uno incentrato sul ruolo degli RNA circolari nella DM1 e uno finalizzato a rimuovere le triplette CTG del gene DMPK e recuperare le normali funzioni cellulari.

Gli studi svolti nell'ambito di questo progetto stati oggetto di 6 pubblicazioni.

1. Voellenkle C, Perfetti A, Carrara M, Fuschi P, Renna LV, Longo M, Baghai SainS, Cardani R, Valaperta R, Silvestri G, Legnini I, Bozzoni I, Furling D, Gaetano C, Falcone G, Meola G, Martelli F. Dysregulation of circular RNAs in myotonic dystrophy type 1. *Int. J. Mol. Sci.* 2019 Apr 19;20(8).
2. Greco S, Cardinali B, Falcone G; Martelli F. Circular RNAs in Muscle Function and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(11), 3454
3. Cappella M, Perfetti A, Cardinali B, Garcia-Manteiga JM, Carrara M, Provenzano C, Fuschi P, Cardani R, Renna LV, Meola G, Falcone G and Martelli F. High-throughput analysis of the RNA induced silencing complex in myotonic dystrophy type 1 patients identifies the dysregulation of miR-29c and its target ASB2. *Cell Death and Disease* (2018) Jun 28;9(7):729.
4. 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
5. Perfetti A, Greco S, Cardani R, Fossati B, Cuomo G, Valaperta R, Ambrogi F, Cortese A, Botta A, Mignarri A, Santoro M, Gaetano C, Costa E, Dotti M.T, Silvestri G, Massa R, Meola G, Martelli F. Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Sci Rep.* 2016 Dec 1;6:38174..
6. Cardinali B, Cappella M, Provenzano C, Garcia-Manteiga JM, Lazarevic D, Cittaro D, Martelli F, Falcone G. MicroRNA-222 regulates muscle alternative splicing through Rbm24 during differentiation of skeletal muscle cells. *Cell Death Dis.* 2016 Feb 4;7:e2086.

Distrofia Miotonica di tipo 1

Coordinator: Fabio Martelli

Partner: Germana Falcone

Duration (N. Years): 3 years  
Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14092

**Disease Name:**

Myotonic Dystrophy Type 1

**Keywords:**

Myotonic dystrophy type 1, microRNAs, skeletal muscle

## **04\_Genetic neurological disorder\Neuromuscular diseases**

## Poster P.04.20

### MODULATING NEUREGULIN-1 SIGNALS TO TREAT HEREDITARY DEMYELINATING NEUROPATHIES

Bolino A.<sup>[1]</sup>, Previtali S.C.<sup>[1]</sup>, D'Antonio M.<sup>[2]</sup>, Taveggia C.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Division of Neuroscience and INSPE, Fondazione Centro San Raffaele ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Division of Genetics and Cell Biology, Fondazione Centro San Raffaele ~ Milano ~ Italy

Charcot Marie Tooth neuropathies are a group of rare disorders of the peripheral nervous system that affects the development and the integrity of myelin, the fatty sheath surrounding the nerves. The most severe forms of the disease can affect children, while the most common forms usually manifests after the third decade of life. CMT neuropathies can be as severe as to shorten lifespan. Many genes responsible for CMT neuropathies have been identified together with their mechanism of action. However, due to their high number and the fact that several different mechanisms causes CMT neuropathies, it is not possible to envisage a common therapeutic strategy for all these disorders.

The Coordinator of this grant teamed up with other groups working at the San Raffaele Institute in Milan, Italy, who have extensive experience in studying hereditary neuropathies. Their goal is to develop a common treatment that might be suitable to treat all forms of CMT neuropathies. The Coordinator has identified a growth factor, present on the surface of the axons that can control the amount of myelin. In addition she found that the activity of this factor could be increased or decreased by using specific drugs.

The multidisciplinary and collaborative approach used by all participants, have contributed to show that these drugs could effectively modulate the extent of myelination in some pre-clinical models of CMT. Though promising, further studies are required to extend these analyses to other forms of CMT, given the high heterogeneity of this class of neuropathies.

Modulazione della Neuregulina 1 come approccio terapeutico per il trattamento di neuropatie ereditarie.

Le neuropatie della famiglia delle Charcot Marie Tooth sono un gruppo di patologie ereditarie dovute ad un danno dello sviluppo e dell'integrità della mielina, l'involucro isolante dei nervi. Le forme più severe della malattia colpiscono i bambini, mentre quelle più comuni, insorgono in genere dopo i trent'anni. Queste neuropatie possono essere così severe da ridurre l'aspettativa di vita. Sono stati identificati molti dei geni che provocano le neuropatie ereditarie, e si è scoperto che le diverse mutazioni colpiscono la funzionalità del nervo con meccanismi differenti. Per questo motivo non è ancora disponibile una cura, ma soprattutto è difficile immaginare una terapia comune che possa essere di beneficio a tutte queste malattie.

Il Coordinatore di questo finanziamento ha riunito diversi gruppi che lavorano al San Raffaele di Milano e che da anni si occupano di studiare le neuropatie ereditarie. Il loro obiettivo in questo studio è di sviluppare una strategia terapeutica che sia comune a tutte le forme di CMT.

Recentemente il Coordinatore ha scoperto un fattore di crescita che controlla la quantità di mielina che si forma attorno ai nervi. Non solo, ha anche scoperto che l'azione di questo fattore può essere aumentata o diminuita usando dei farmaci specifici. L'approccio multidisciplinare e complementare usato dai gruppi partecipanti a questo studio, ha dimostrato che l'utilizzo di questi farmaci possa effettivamente controllare la quantità di mielina che si forma in alcuni modelli animali di CMT. Sebbene

i risultati ottenuti siano promettenti, sono necessari studi ulteriori che consentano di ampliare queste analisi in altri modelli di CMT.

Bolino A., Piguet F., Alberizzi V., Pellegatta M., Rivellini C., Guerrero-Valero M., Nosedà R., Brombin C., Nonis A., D'Adamo P., Taveggia C., Previtali S.C. Niacin-mediated TACE activation ameliorates CMT neuropathies with focal hypermyelination. *EMBO Mol Med* 2016. 8:1438-1454.

Pareyson D, Stojkovic T, Reilly MM, Leonard-Louis S, Laurà M, Blake J, Parman Y, Battaloglu E, Tazir M, Bellatache M, Bonello-Palot N, Lévy N, Sacconi S, Guimarães-Costa R, Attarian S, Latour P, Solé G, Megarbane A, Horvath R, Ricci G, Choi BO, Schenone A, Gemelli C, Geroldi A, Sabatelli M, Luigetti M, Santoro L, Manganelli F, Quattrone A, Valentino P, Murakami T, Scherer SS, Dankwa L, Shy ME, Bacon CJ, Herrmann DN, Zambon A, Tramacere I, Pisciotta C, Magri S, Previtali SC, Bolino A.,

A multicentre retrospective study of Charcot-Marie-Tooth disease type 4B (CMT4B) due to mutations in Myotubularin-related proteins (MTMRs). *Annals of Neurology* 2019 May 9. doi: 10.1002/ana.25500.

Zambon A, Natali Sora MG, Cantarella G, Cerri F, Quattrini A, Comi G, Previtali SC, Bolino A. Vocal cord paralysis in Charcot-Marie-Tooth type 4B1 disease associated with a novel mutation in the myotubularin-related protein 2 gene: a case report and review of the literature. *Neuromuscul Disord.* 2017 Jan 16. pii: S0960-8966(16)30977-4. doi: 10.1016/j.nmd.2017.01.006.

Scapin C., Ferri C., Pettinato E., Zambroni D., Bianchi F., Del Carro U., Caruso D., Mitro N., Belin S., Pellegatta M., Taveggia C., Schwab M., Nave K.A., Feltri M.L., Wrabetz L., D'Antonio M., "Enhanced Neuregulin-1 type-III signaling ameliorates neurophysiology and hypomyelination in a Charcot-Marie-Tooth type 1B mouse model" *Hum. Mol. Genetics*, 28(6): 992-1006, 2019, doi: 10.1093/hmg/ddy411 PMID: 30481294

Volpi V.G., Ferri C., Fregno I., Del Carro U., Bianchi F., Scapin C., Pettinato E., Solda T., Feltri M.L., Molinari M., Wrabetz L., D'Antonio M. "Schwann cells ER-associated degradation contributes to myelin maintenance in adult nerves and limits demyelination in CMT1B mice" *PLoS Genetics*, 15(4):e1008069, 2019 doi: 10.1371/journal.pgen.1008069, PMID: 30995221

Pellegatta M. Taveggia C. The complex work of proteases and secretases in Wallerian Degeneration: beyond Neuregulin-1. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2019. 20;13:93. doi: 10.3389/fncel.2019.00093. eCollection 2019.

Neuropatie ereditarie Charcot Marie Tooth

Coordinator: Carla Taveggia

Partners: Alessandra Bolino, Stefano C. Previtali, Maurizio D'Antonio

Duration (N. Years): 4

Startin year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15012

**Disease Name:**

Charcot Marie Tooth Hereditary Neuropathies

**Keywords:**

Charcot-Marie-Tooth (CMT), Nerve regeneration, Drug therapy

## Poster P.04.21

### GENE THERAPY AND LONG TERM EVALUATION OF DIFFERENT DIETARY REGIMENS IN A GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE III KO MOUSE MODEL

Pagliarani S.<sup>[1]</sup>, Lucchiari S.<sup>[1]</sup>, Vidal P.<sup>[3]</sup>, Ripolone M.<sup>[2]</sup>, Fortunato F.<sup>[1]</sup>, Moggio M.<sup>[2]</sup>, Ronzitti G.<sup>[3]</sup>, Mingozi F.<sup>[3]</sup>, Comi G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli Studi di Milano ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Ospedale Maggiore Policlinico Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>INTEGRARE, Genethon, Inserm, Univ Evry, Université Paris-Saclay ~ Evry ~ France

Glycogen disease type III (GSDIII) is a rare monogenic disorder due to glycogen debranching enzyme (GDE) deficiency. In infancy and childhood, main symptoms are hepatomegaly, ketotic hypoglycaemia, hyperlipidemia, high transaminase levels, and growth delay. These signs gradually decrease in adolescence, though an apparent glycaemic control may hide a progressive liver fibrosis and hepatic adenomas. Skeletal myopathy develops since the second decade of life and may progressively worsen to partial or complete disability.

We developed a knock-out (KO) mouse model of GSDIII and we evaluated high protein treatments differing in their protein and carbohydrate contents, namely high protein (HP; 45.9% protein) and glucose free (GF; 53.4% protein) diets. Though both diets ameliorated muscle performance, GF diet showed the best results: mice were able to run on a treadmill until 10 months of age vs 5 months of age for untreated and HP mice. GF mice showed decreased vacuolization of muscle fibres and decreased muscle glycogen content; hepatomegaly was reduced. Taken together, these data are suggestive of a better metabolic compensation in mice treated with a glucose free/high protein diet. Liver expression profiling of GF mice showed an increased gene expression of gluconeogenesis and Krebs cycle indicating the use of dietary proteins both for the production of glucose to sustain glycaemia, and of energy to sustain metabolic requirements. Ongoing studies on a new diet called low carb (LC; this is a high protein/high fat/low carbohydrate diet) have shown promising results on fasting hypoglycaemia, reduction of glycogen content in skeletal muscle and heart, and on hepatomegaly in mice treated for two months.

Another goal of this project was to generate proof-of-concept data for GDE gene therapy in the GSDIII mouse model. Given the predominant skeletal muscle and liver involvement in this disease, both liver and muscle were transduced with tissue-specific dual vector constructs. The overexpression of GDE in skeletal muscle led to a functional rescue and a decrease of glycogen content in muscle, but it had no effects on the liver signs of the disease. The overexpression of GDE in the liver using a dual-overlapping AAV system had a direct impact on blood glucose levels and dramatically decreased the liver glycogen content.

These promising data support our work on both dietary and gene therapy as valid and reliable approaches to improve the disease course, to improve the quality of life of patients and in the near future be able to cure GSDIII.

Terapia genica e valutazione nel lungo periodo di diversi tipi di dieta in un modello murino KO di Glicogenosi di tipo III.

La Glicogenosi di tipo III (GSDIII) è una malattia monogenica causata dal deficit di enzima deramificante (GDE) che è necessario per la scissione del glicogeno in glucosio. Nell'infanzia, i sintomi principali sono ingrossamento del fegato, crisi ipoglicemiche, iperlipidemia, transaminasi alte e



ritardo di crescita. Questi sintomi regrediscono durante l'adolescenza. La miopatia si sviluppa durante la vita adulta e progressivamente può peggiorare fino alla perdita della deambulazione.

Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato un modello animale che riproduce le caratteristiche della GSDIII. Abbiamo somministrato due diverse diete con differente contenuto di proteine e di carboidrati: la dieta high protein (HP) e la dieta glucose free (GF). I topi GSDIII trattati con la dieta GF sono in grado di correre sul tapis roulant fino a 10 mesi di vita, mentre i non trattati e quelli trattati con la dieta HP solo fino ai 5 mesi. I topi trattati mostrano fibre muscolari con meno vacuoli; inoltre, il dosaggio del contenuto di glicogeno nei tessuti mostra una riduzione rispetto ai topi non trattati. Anche le dimensioni del fegato sono ridotte rispetto ai topi non trattati. Questi dati suggeriscono che la dieta GF può indurre una miglior compensazione metabolica nei topi GSDIII. Questo indica che le proteine introdotte sono utilizzate sia per la produzione di glucosio per mantenere la glicemia (gluconeogenesi), sia per la produzione dell'energia necessaria alle cellule epatiche (ciclo di Krebs). Sono inoltre in corso studi con una dieta ricca in grassi e proteine e povera di carboidrati. I dati preliminari su topi che sono stati trattati per 2 mesi mostrano che questa dieta è in grado di ridurre il contenuto di glicogeno nel muscolo e nel cuore, ridurre l'epatomegalia e aumentare i livelli di glucosio nel sangue degli animali a digiuno.

Questo progetto è volto anche allo studio della terapia genica basata su di una strategia dual-vector e applicata alla GSDIII. Il gene dell'enzima deramificante è molto grande e difficilmente può essere inserito integralmente in un vettore per terapia genica (AAV). Sono stati quindi prodotti vettori chiamati dual vector: uno contenente la prima parte del gene e un vettore contenente la seconda parte del gene. I vettori sono stati targettati selettivamente al muscolo scheletrico o al fegato. L'espressione nel muscolo ha portato ad un miglioramento funzionale ed alla diminuzione del glicogeno muscolare. L'espressione nel fegato ha mostrato l'aumento dei livelli di glucosio nel sangue e la diminuzione del glicogeno epatico.

Questi dati promettenti sostengono lo sviluppo del nostro lavoro sia sulla terapia genica che sulla terapia dietetica come validi approcci per migliorare il corso della malattia e la qualità della vita dei pazienti e portare in un prossimo futuro alla cura della GSDIII.

- Pagliarani S, Lucchiari S, Ulzi G, Violano R, Ripolone M, Bordoni A, Nizzardo M, Gatti S, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Glycogen storage disease type III: A novel Agl knockout mouse model. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1842(11):2318-28. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.07.029.

- Pagliarani S, Lucchiari S, Ulzi G, Ripolone M, Violano R, Fortunato F, Bordoni A, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Glucose-free/high-protein diet improves hepatomegaly and exercise intolerance in glycogen storage disease type III mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Oct;1864(10):3407-3417. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.031.

- Vidal P, Pagliarani S, Colella P, Costa Verdera H, Jauze L, Gjorgjieva M, Puzzo F, Marmier S, Collaud F, Simon Sola M, Charles S, Lucchiari S, van Wittenberghe L, Vignaud A, Gjata B, Richard I, Laforet P, Malfatti E, Mithieux G, Rajas F, Comi GP, Ronzitti G, Mingozi F. Rescue of GSDIII Phenotype with Gene Transfer Requires Liver- and Muscle-Targeted GDE Expression. *Mol Ther*. 2018 Mar 7;26(3):890-901. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.12.019.

Glicogenosi di tipo III

Coordinator: Giacomo Pietro Comi

Partner: Federico Mingozi

Duration (N. Years): 4  
Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15051

**Disease Name:**

Glycogen Storage Disease Type III

**Keywords:**

GSDIII, gene therapy, dietary treatment

## Poster P.04.22

### **MITMED CONSORTIUM: FROM THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NUCLEAR GENES RESPONSIBLE FOR HUMAN MITOCHONDRIAL DISORDERS TOWARDS POTENTIAL THERAPEUTIC APPROACHES IN EXPERIMENTAL MODELS**

Nasca A.<sup>[1]</sup>, Legati A.<sup>[1]</sup>, Lamantea E.<sup>[1]</sup>, Lamperti C.<sup>[1]</sup>, Baruffini E.<sup>[2]</sup>, Dallabona C.<sup>[2]</sup>, Lodi T.<sup>[2]</sup>, Goffrini P.<sup>[2]</sup>, Brischiari M.<sup>[3]</sup>, Corrà S.<sup>[3]</sup>, De Pittà C.<sup>[3]</sup>, Martorano L.<sup>[3]</sup>, Tiso N.<sup>[3]</sup>, Argenton F.<sup>[3]</sup>, Donnini C.<sup>[2]</sup>, Costa R.<sup>[3]</sup>, Ghezzi D.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Besta ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Parma ~ Parma ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Padova ~ Padova ~ Italy

The genetic cause of mitochondrial disorders (MD) includes mutations in either mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA. The broad genetic heterogeneity of MD is a problem not only to identify new responsible genes, but also to achieve molecular diagnosis by screening known disease genes. For this reason, the genetic defect remains unknown in a large fraction of MD patients. For this project (MidMed), we have used Next Generation Sequencing approaches to identify new disease-genes and to improve genetic diagnosis in our cohort of MD patients. By using this technique, we have found mutations in nuclear genes not previously associated with MD and several novel variants in known disease-genes, often associated with atypical presentations thus allowing a broadening of the molecular and clinical spectrum.

Yeast, fly and zebrafish models mimicking mutations in MPV17, responsible of hepatocerebral mtDNA depletion in humans, have been previously created and, during this project, further characterized to gain insight on mechanism of disease. Additional models for APOPT1, mutations of which we published as cause of mitochondrial leukoencephalopathy, have been exploited.

Finally, we have looked at drugs or supplements which have positive properties on mitochondrial functioning, either in specific genetic conditions or as generalized effect. Preliminary screening in yeast models led to the identification of molecules with possible beneficial effects; nevertheless, these substances did not give improvement in mutant cells from patients. Contrariwise amino acid supplementation in a specific subgroup of MD gave positive results in yeast and cell models and is currently under investigation in a clinical trial on patients.

With the MitMed project, we have obtained a translational impact from the work done and the knowledge reached in the last years, improving the percentages of MD individuals with genetic diagnosis, and testing potential pharmacological approaches.

### **CONSORZIO MITMED: DALL'IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI GENI NUCLEARI RESPONSABILI DI MALATTIE MITOCONDRIALI VERSO POTENZIALI APPROCCI TERAPEUTICI IN MODELLI SPERIMENTALI**

Le malattie mitocondriali (MM) possono essere causate da mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) o del DNA nucleare. Questa ampia eterogeneità risulta problematica non solo per identificare nuovi geni malattia, ma anche per diagnosticare il difetto genetico in una MM.

Per questo progetto (MidMed), abbiamo utilizzato approcci di sequenziamento di nuova generazione per identificare nuovi geni di malattia e migliorare la diagnosi genetica nella nostra coorte di pazienti con MM. Abbiamo trovato mutazioni in geni nucleari non precedentemente associati a MM e diverse

nuove varianti in geni di malattia noti, spesso associati a presentazioni atipiche che hanno portato ad un ampliamento dello spettro clinico e molecolare.

Sono stati precedentemente creati modelli di lievito, mosca e zebrafish che mimano le mutazioni in MPV17, responsabile della deplezione epatocerebrale del mtDNA nell'uomo, e, durante questo progetto, sono stati caratterizzati per ottenere informazioni sul meccanismo della malattia. Sono stati indagati anche modelli per APOPT1, gene che abbiamo descritto come causa di leucoencefalopatia mitocondriale.

Infine, abbiamo esaminato farmaci o integratori che hanno proprietà positive sul funzionamento mitocondriale, in specifiche condizioni genetiche o come effetto generalizzato. Lo screening preliminare nei modelli di lievito ha portato all'identificazione di molecole con possibili effetti benefici; tuttavia, queste sostanze non hanno migliorato il fenotipo nelle cellule dei pazienti. Al contrario, la supplementazione di aminoacidi in uno specifico sottogruppo di MM ha dato risultati positivi nei modelli di lievito e cellule ed è attualmente in fase di studio in uno studio clinico su pazienti.

Con il progetto MidMed, abbiamo ottenuto un impatto traslazionale dal lavoro svolto e dalle conoscenze raggiunte negli ultimi anni, migliorando le percentuali di individui MM con diagnosi genetica e testando potenziali approcci farmacologici.

#### Malattie Mitocondriali

Coordinator: Daniele Ghezzi

Partners: Rodolfo Costa, Claudia Donnini

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

#### **Telethon Project (nr):**

GGP15041

#### **Disease Name:**

Mitochondrial Diseases

#### **Keywords:**

mitochondrial disease, Next generation sequencing, Animal models

## Poster P.04.23

### CLINICAL EFFICACY OF NIV AND MODAFINIL ON EXCESSIVE DAYTIME SLEEPINESS: LESSONS LEARNED FROM A MULTICENTER, RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED CLINICAL TRIAL IN DM1

**Sansone V.**<sup>[1]</sup>, Mauro L.<sup>[2]</sup>, Ferrari Aggradi C.<sup>[2]</sup>, Proserpio P.<sup>[4]</sup>, Massa R.<sup>[5]</sup>, Frezza E.<sup>[5]</sup>, Greco G.<sup>[5]</sup>, Rubino A.<sup>[4]</sup>, Spanetta M.<sup>[6]</sup>, Romigi A.<sup>[6]</sup>, Izzi F.<sup>[7]</sup>, Placidi F.<sup>[7]</sup>, Liguori C.<sup>[7]</sup>, Nobili L.<sup>[4]</sup>, Pirola A.<sup>[2]</sup>, Cattaneo F.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Neurorehabilitation Unit, University of Milan ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>The NEMO Clinical Center ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>~ Italy,

<sup>[4]</sup>Sleep Medicine, Dept. Neuroscience, Niguarda Hospital ~ Milan ~ Italy, <sup>[5]</sup>Neurology Dept. University of Rome Tor Vergata ~ Rome ~ Italy, <sup>[6]</sup>Neuromed ~ Pozzilli ~ Italy, <sup>[7]</sup>Sleep Medicine, University of Rome Tor Vergata ~ Rome ~ Italy

**Background:** Excessive daytime sleepiness (EDS) is a major complaint in adult-onset DM1. It is mostly of central origin but it may coexist with sleep-related breathing disorder (SRBD). It is a major complaint in adult-onset DM1 and symptoms often overlap with fatigue, apathy and muscle weakness. Assessments vary, and only a minority of patients are regularly tested for EDS and for chronic respiratory insufficiency or are on treatment.

**Aims:** (i) To describe the prevalence of EDS in a cohort of patients with adult-onset DM1 in Italy while providing information on sleep architecture, respiratory function, sleep-related breathing disorders (SRBD) and central sleep apneas associated with EDS; (ii) To determine the effects of modafinil and NIV on EDS in patients with DM1 using quantitative assessments and PROMs.

**Methods:** 94 adult-onset patients with genetically determined DM1 (CTG range 600-800 repeats) were screened for EDS as determined by MSLT. Patients having respiratory insufficiency were adapted to nocturnal NIV as per GCP. If EDS persisted, despite a good compliance to NIV (> 4 hours per night), patients were randomized to modafinil or placebo while on NIV. EDS, cognition, mood, motor performance, and QoL assessments were repeated at 3 and 6 months from randomization. Patients were also asked to fill in a sleep diary and to use actigraphy for 1 week prior to randomization and prior to follow-up.

**Results:** Charts from 187 patients with genetically determined DM1 (CTG range 600-800 repeats) were reviewed for EDS by PROMs (Epworth Sleepiness Scale, ESS) and for chronic respiratory impairment. The PSG and MSLT but not the Epworth Sleepiness Scale (ESS) gave evidence of EDS in 30 of 100 adult patients with DM1. Modafinil improved EDS in all patients on treatment (n = 16). NIV corrected EDS in 40% of patients having SRBD. Compliance was low. Sleep diaries and actigraphy showed a significantly reduced circadian periodicity as compared with controls. Nocturnal sleep indicated a prolonged mean cycle duration and decreased stability and temporal structure of NREM/REM cycle.

**Conclusions:** i) EDS needs to be assessed with quantitative tests and not PROMs; ii) EDS is multifactorial with a predominant central component and sleep architecture dysruption may play a role; iii) Actigraphy may be a useful outcome in clinical trials to monitor treatment interventions on muscle as well as on CNS functions.

L'efficacia della ventilazione non-invasiva (NIV) e del modafinil sull'eccessiva sonnolenza diurna: esperienza acquisita da uno studio multicentrico, randomizzato, doppio-cieco, placebo- controllato nella Distrofia Miotonica di tipo 1 (DM1)

Premesse: L'eccessiva sonnolenza diurna (EDS) è uno dei principali sintomi nella DM1. Ha una origine prevalentemente centrale ma può associarsi anche un disturbo del respiro sonno-relato

(SRBD). I sintomi della EDS spesso si sovrappongono a quelli di fatica, apatia e di debolezza muscolare. I protocolli diagnostici variano da Centro a Centro e solo una minoranza dei pazienti è regolarmente valutata per EDS o per la presenza di insufficienza respiratoria cronica o sono in trattamento.

Obiettivi: (i) Descrivere la prevalenza di EDS in una coorte di pazienti con la forma di DM1 ad esordio adulto in Italia, valutando anche aspetti dell'architettura del sonno, della funzionalità respiratoria, dei disturbi del respiro sonno-relati e della componente di apnee centrali associate alla EDS; (ii) valutare gli effetti del modafinil e della NIV sulla EDS nei pazienti con DM1 utilizzando misure oggettive e soggettive (PROMs).

Metodi: 94 pazienti con DM1 geneticamente determinata ad esordio adulto adult-onset patients with (CTG range 600-800 ripetizioni) sono stati sottoposti a screening per EDS utilizzando il Multiple Sleep Latency Test (MSLT). I pazienti con insufficienza respiratoria cronica sono stati adattati alla NIV secondo GCP. Se nonostante questo persisteva EDS, i pazienti venivano randomizzati a modafinil o placebo pur in NIV. Le valutazioni per il monitoraggio della EDS, degli aspetti cognitivi, dell'umore, della funzionalità neuromotoria e delle percezioni di qualità di vita sono stati ripetuti dopo 3 e 6 mesi dalla randomizzazione. I pazienti dovevano anche compilare diari del sonno specifici e indossare actigrafi per monitorare il ritmo sonno-veglia ed il pattern del sonno.

Risultati: Sono stati analizzate le cartelle cliniche di 187 pazienti per valutare la presenza o meno di EDS secondo la scala soggettiva per EDS (Epworth Sleepiness Scale, ESS) e la presenza di insufficienza respiratoria cronica. La polisonnografia e lo studio MSLT ma non la ESS sono stati in grado di rilevare la EDS in 30 di 100 pazienti con DM1. Il Modafinil ha migliorato la EDS in tutti i pazienti in trattamento (n = 16). La NIV è stata in grado di correggere la insufficienza respiratoria cronica nel 40% in cui vi erano SRBD. La compliance alla NIV è stata bassa. I diari del sonno e gli actigrafi hanno mostrato un'alterazione del ciclo del sonno rispetto ai controlli.

Conclusioni: i) Il monitoraggio della EDS deve avvenire con misure quantitative e non solo con PROMs; ii) La EDS è multifattoriale con una componente centrale predominante in cui la disregolazione dell'architettura del sonno può svolgere un ruolo importante; iii) L'actigrafia può essere una misura di outcome utile per monitorare gli effetti di un trattamento quando siano implicati effetti su componenti sia neuroperiferiche sul muscolo che centrali.

-

Distrofia Miotonica di Steinert

Coordinator: Valeria Sansone

Partners: Lino Nobili, Roberto Massa, Fabio Placidi

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GUP15004

**Disease Name:**

Myotonic Dystrophy Type 1, Steinert Disease

**Keywords:**

## Poster P.04.24

### PRE-CLINICAL IDENTIFICATION OF DRUGS TARGETING POLG DISORDERS BY USING A ZEBRAFISH/YEAST TRANS-SPECIES APPROACH (ZIPPY)

Baruffini E.<sup>[1]</sup>, Lodi T.<sup>[1]</sup>, Donnini C.<sup>[1]</sup>, Delahodde A.<sup>[2]</sup>, Beffagna G.<sup>[4]</sup>, Facchinello N.<sup>[3]</sup>, Tiso N.\*<sup>[3]</sup>, Argenton F.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma ~ Parma ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell, Université Paris-Sud ~ Orsay ~ France, <sup>[3]</sup>Department of Biology, University of Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[4]</sup>Department of Cardio-Thoraco-Vascular Sciences and Public Health ~ Padova ~ Italy

In humans, the mitochondrial DNA (mtDNA) is replicated by the DNA polymerase gamma (POLG) and its accessory unit POLG2, both encoded by nuclear genes. Mutations in these genes cause at least six mitochondrial diseases with Mendelian inheritance, collectively named POLG-related disorders, characterized by mtDNA depletion or accumulation of multiple deletions. To date, more than 300 pathogenic mutations have been reported in the Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database. The mutations are associated with a spectrum of clinical presentations, ranging from infantile-onset epilepsies, liver failure, polyneuropathy, ataxia, dilated/hypertrophic cardiomyopathy to late-onset ophthalmoplegia and muscle weakness. To a limited extent, clinical phenotypes correlate with the mtDNA phenotype.

The therapeutic treatment of POLG diseases is currently limited to symptom management.

Taking advantage of simple and cost-effective models, such as the unicellular yeast and the invertebrate *C. elegans*, we have already identified a panel of yeast/worm-prescreened drugs, worth to be investigated in a vertebrate setup; in parallel, we have generated Polg and Polg2 mutants in the vertebrate zebrafish, faithfully modelling the human condition.

The main goal of our project is the identification of drugs with therapeutic effects on mitochondrial pathologies linked to POLG or POLG2 genes. We will adopt a multi-species approach, based on drug pre-screen in Polg-deficient yeast (*mip1*) and *C. elegans* (*polg-1*) strains, followed by drug validation in zebrafish (*zf*) Polg and Polg2 mutants.

The screen of drugs in yeast will be performed by evaluating the rescue of respiratory growth defects due to mtDNA instability ("petite" phenotype) in *mip1* mutants. More in-depth analysis will include quantitative evaluation of *Mip1* expression, respiratory activity and mtDNA levels. Positive hits will be analyzed in *zf* Polg models, evaluating the rescue of pathological phenotypes, including mtDNA depletion, impaired respiratory activity and altered mt-nucleus retrograde signaling.

Identificazione di farmaci per le patologie POLG tramite test su sistemi lievito-zebrafish (ZIPPY)

All'interno delle cellule umane esistono degli organelli, chiamati mitocondri, che assolvono il compito di piccole centrali energetiche. Questi organelli sono dotati di un proprio patrimonio genetico, chiamato DNA mitocondriale, la cui quantità ed integrità viene mantenuta dal lavoro di due proteine, POLG e POLG2. Se, a causa di mutazioni, queste due proteine non funzionano, si genera una serie di malattie chiamate collettivamente patologie POLG-collegate. Questi disordini possono manifestarsi, a seconda dei casi, con epilessie infantili, insufficienza epatica, neuropatia, cardiomiopatia, disfunzione della mobilità oculare, perdita di coordinazione e debolezza muscolare.

Allo stato attuale non esistono farmaci per contrastare le patologie POLG e il loro trattamento si limita alla gestione dei sintomi.

Il nostro progetto intende saggiare una rosa di farmaci che ha già avuto dei riscontri positivi su due

organismi molto semplici, il lievito *S. cerevisiae* e il verme *C. elegans*. Questi farmaci verranno ora testati su nuovi modelli per queste malattie, altrettanto miniaturizzati ma molto più complessi, rappresentati da embrioni di pesce zebrafish, mutati negli stessi geni per le proteine POLG e POLG2. Poiché recentemente il nostro gruppo ha identificato un farmaco con effetti curativi simili in lievito, verme e pesce, questo ci incoraggia a tentare l'impresa su ampia scala, alla ricerca di un maggior numero di molecole con efficacia terapeutica per le patologie POLG.

Rahman S, Copeland WC. POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nat Rev Neurol.* 2019 Jan;15(1):40-52. PMID: 30451971

Patologie POLG-collegate

Coordinator: Francesco Argenton

Partner: Enrico Baruffini

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19287

**Disease Name:**

Polg-Related Diseases

**Keywords:**

POLG, yeast, zebrafish



## Poster P.04.25

### REGISTRY FOR TRIAL READINESS IN SPINAL AND BULBAR MUSCLE ATROPHY

Fenu S.\*<sup>[1]</sup>, Soraru" G.<sup>[2]</sup>, Mariotti C.<sup>[1]</sup>, Sabatelli M.<sup>[3]</sup>, Querin G.<sup>[2]</sup>, Gellera C.<sup>[1]</sup>, Conte A.<sup>[3]</sup>, Calabrese D.<sup>[1]</sup>, Chiapparini L.<sup>[1]</sup>, Aquino D.<sup>[1]</sup>, Filosto M.<sup>[4]</sup>, Casali C.<sup>[5]</sup>, Silani V.<sup>[6]</sup>, Riva N.<sup>[7]</sup>, Mora G.<sup>[8]</sup>, Lunetta C.<sup>[9]</sup>, Giannini F.<sup>[10]</sup>, Bisogni G.<sup>[3]</sup>, Vitelli E.<sup>[11]</sup>, Montesano M.<sup>[1]</sup>, Pareyson D.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta ~ MILANO ~ Italy, <sup>[2]</sup>Università di Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Policlinico Agostino Gemelli ~ Roma ~ Italy, <sup>[4]</sup>ASST Spedali Civili di Brescia ~ Brescia ~ Italy, <sup>[5]</sup>Università La Sapienza ~ Roma ~ Italy, <sup>[6]</sup>Istituto Auxologico Italiano ~ MILANO ~ Italy, <sup>[7]</sup>Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy, <sup>[8]</sup>Fondazione IRCCS Salvatore Maugeri ~ Milano ~ Italy, <sup>[9]</sup>Centro Clinico Nemo ~ Milano ~ Italy, <sup>[10]</sup>Azienda Ospedaliera Universitaria Senese ~ Siena ~ Italy, <sup>[11]</sup>Ospedale di Lodi ~ Lodi ~ Italy

Spino-Bulbar Muscular Atrophy (SBMA) is a rare, slowly progressive X-linked neurodegenerative disorder, associated with a CAG repeat expansion in the androgen receptor gene, that causes wasting and weakness of facial, bulbar and limb muscles. No treatment is available, but several therapeutic compounds are under investigation and clinical trial readiness is a priority.

We developed a National SBMA Registry to obtain data on SBMA epidemiology, facilitate recruitment in clinical trials, test outcome measures, perform a natural history study, and build a biorepository.

This is a dual Registry (<https://www.registronmd.it>) where the patients register themselves, choose a reference centre among three in Italy (Milan, Padua, Rome, with 23 other supporting centres), where the clinicians collect a minimal dataset of information and clinical measures. Collected information includes: family data, pedigree, repeat length; clinical evaluation (spinal and bulbar involvement and sensory signs); clinical scales: SBMA-FRS (SBMA Functional Rating Scale, range 0-56, worst score 0, normal score 56); AMAT (Adult Myopathy Assessment Tool, range 0-45, severe 0-24, moderate 25-34, mild/normal 35-45); 6MWT (6 minute walking test); IIEF (International Index of Erectile Function); IPSS (International Prostate Symptoms Scale); blood test exams; standard and modified ECG (for Brugada-like pattern); spirometry; and a qMRI (quantitative muscle MRI) of thigh and leg with 3-point Dixon sequences to measure muscle fatty substitution consequent to denervation in a subgroup of patients. The biorepository includes storage of serum, plasma, DNA, immortalized lymphocytes, and when available fibroblasts and myocytes. Visits are repeated every year. All data are encrypted.

117 patients have registered thus far, mean age 61.3±11.2 years, range 31-82. Most of them are from Veneto (31 patients), Lombardia (26), Emilia Romagna (20), Lazio (18); Toscana (7), Friuli Venezia Giulia (5); others are from Piemonte, Abruzzo, Campania, Molise, Sardegna and Puglia.

The CAG repeat number range is 39-57, mean 45.2±3.2. Weakness onset occurred at mean age of 45.2 years, range 29-69. 100 patients had gynecomastia (92 bilateral, 8 unilateral), 25 diabetes or glucose intolerance, 41 hypertension, 17 liver dysfunction.

Clinical scales' values (mean±SD, range) are the following: SBMA-FRS: 44.3±6.6, 24-56; AMAT: 27.3±10.8, 1-45; 6MWT (meters): 364.4±129, 90-625. Eighteen patients underwent q-MRI, 14 had a second MRI, and 7 a third one.

Analyses of data from the Registry are giving results important to know epidemiology across Italy and prepare for forthcoming clinical trials.

#### REGISTRO PER L'ATROFIA MUSCOLARE BULBO-SPINALE.

L'atrofia muscolare spino-bulbare (SBMA) è una malattia neurodegenerativa causata da un'espansione di triplette CAG nel gene del recettore degli androgeni sul cromosoma X, che causa

debolezza della muscolatura facciale, bulbare e degli arti.

Non vi sono trattamenti efficaci, ma diversi composti sono in studio. Essere pronti per le sperimentazioni cliniche farmacologiche è una priorità.

Abbiamo creato un Registro Nazionale per conoscere l'epidemiologia della malattia, facilitare il reclutamento nelle sperimentazioni cliniche, valutare misure di outcome e storia naturale di patologia, costruire un biorepository.

E' un registro duale (<https://www.registronmd.it>) compilato dal paziente - che si registra, sceglie un centro di riferimento tra tre in Italia (Milano, Padova, Roma, con altri 23 centri di supporto) - e dal medico che raccoglie i dati clinici.

Il protocollo comprende la raccolta di: minimal dataset di informazioni (anamnesi familiare, albero genealogico, numero di triplette ripetute al test genetico); valutazione clinica (coinvolgimento spino-bulbare, segni sensitivi); somministrazione di scale cliniche: SBMA-FRS (SBMA Functional Rating Scale, range 0-56, 0 punteggio peggiore, 56 normale); AMAT (Adult Myopathy Assessment Tool, range 0-45, grave 0-24, moderato 25-34, lieve/normale 35-45); 6MWT (test del cammino in 6 minuti); IIEF (International Index of Erectile Function); IPSS (International Prostate Symptoms Scale); esami ematochimici; ECG; spirometria; Risonanza Magnetica quantitativa del muscolo (coscia e gamba) con sequenze Dixon in un sottogruppo di pazienti per misurare la sostituzione adiposa del muscolo causata dal processo di perdita di innervazione; costruzione di un biorepository (conservazione di siero, plasma e DNA, linfociti immortalati, ove possibile fibroblasti e miociti). Le visite sono annuali. I dati sono completamente anonimizzati.

Attualmente sono registrati 117 soggetti affetti da SBMA; età media 61.3 anni (range 31-82). La maggior parte proviene dal Veneto (31 pazienti), Lombardia (26), Emilia Romagna (20), Lazio (18), Toscana (7), Friuli Venezia Giulia (5).

Il range di espansione delle triplette CAG è compreso fra 39 e 57, valori medi  $45.2 \pm 3.2$ . L'età media di esordio della debolezza muscolare è 45.2 anni, range 29-69. 100 pazienti presentano ginecomastia (92 bilaterale, 8 unilaterale), 25 sono affetti da diabete o intolleranza al glucosio, 41 da ipertensione, 17 hanno segni di disfunzione epatica.

Le scale cliniche mostrano i seguenti valori: SBMA-FRS:  $44.3 \pm 6.6$  (range 24-56); AMAT:  $27.3 \pm 10.8$  (1-45); 6MWT (metri):  $364.4 \pm 129$  (90-625). 18 pazienti hanno eseguito la risonanza magnetica muscolare, 14 hanno effettuato una risonanza di controllo e 7 una terza risonanza.

L'analisi dei dati ottenuti consente una migliore conoscenza dell'epidemiologia della malattia e di preparare al meglio le prossime sperimentazioni cliniche farmacologiche.

Dahlqvist: "Disease progression and outcome measures in spinobulbar muscular atrophy", Ann Neurol 2018

Querin: "Kennedy disease (X-linked recessive bulbospinal neuronopathy): A comprehensive review from pathophysiology to therapy", Rev Neurol. 2017

Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare

Coordinator: Caterina Mariotti

Partners: Davide Pareyson, Giovanni Sorarù, Mario Sabatelli

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GUP15009

**Disease Name:**

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)

**Keywords:**

SBMA, Registry, Clinical trial

## Poster P.04.26

### PHOSPHORYLATION-MEDIATED CHANGES OF ANDROGEN RECEPTOR STRUCTURE AND FUNCTION IN SPINAL AND BULBAR MUSCULAR ATROPHY PATHOGENESIS

Piol D.<sup>[1]</sup>, Tosatto L.<sup>[2]</sup>, Minervini G.<sup>[1]</sup>, Lia F.<sup>[1]</sup>, Basso M.<sup>[2]</sup>, Tosatto S.<sup>[1]</sup>, Pandey U.<sup>[3]</sup>, Pennuto M.\*<sup>[4]</sup>, Zuccaro E.<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Trento ~ Trento ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Pittsburg ~ Pittsburg ~ United States of America, <sup>[4]</sup>~ Italy

Kennedy disease, also known as spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), is an X-linked neuromuscular disorder characterized by the progressive dysfunction and loss of lower motor neurons. SBMA is caused by the expansion of a CAG tandem repeat encoding a polyglutamine (polyQ) tract in the gene coding for androgen receptor (AR). Although the structure and function of AR are well known, the relationship between primary-secondary-ternary structure, post-translational modifications (PTMs), and its native function-transcription factor- remains elusive. By undertaking a multidisciplinary approach spanning from experimental biology to biophysics and computational biology, we obtained evidence that phosphorylation at specific sites modifies not only the structure of the highly disordered amino-terminal domain, but also of its native function. We obtained evidence that phosphorylation of polyQ-AR by cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) at serine 96 increases toxicity, leading to polyQ-AR stabilization and aggregation. Moreover, crossing SBMA flies and mice with CDK2 null models ameliorated SBMA phenotype. To gain insights into the role of this phosphorylation, we performed structural analysis of phosphomimetic and phosphodeficient mutants at this site, identifying structural variations that lead to changes in AR function. Kinase and phosphatase screenings allowed us to establish new protein networks that link AR phosphorylation with function. These observations have great impact on the understanding of the molecular mechanisms by which polyQ-AR exerts its toxic function in neurons and other disease-related tissues.

Modifiche post-traduzionali del recettore degli androgeni ne influenzano la struttura e funzione e hanno ripercussione sulla malattia di Kennedy

La malattia di Kennedy, nota anche come atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA), è una malattia neuromuscolare caratterizzata dalla disfunzione progressiva e dalla perdita dei motoneuroni inferiori. SBMA è causato dall'espansione di una ripetizione in tandem CAG che codifica un tratto di poliglutamina (poliQ) nel gene codificante per il recettore degli androgeni (AR). Sebbene la struttura e la funzione di AR siano ben note, la relazione tra la struttura primario-secondaria-ternaria, le modifiche post-traduzionali (PTM) e la sua funzione nativa rimane sfuggente. Adottando un approccio multidisciplinare che spazia dalla biologia sperimentale alla biofisica e alla biologia computazionale, abbiamo ottenuto prove che la fosforilazione in siti specifici modifica non solo la struttura del dominio amino-terminale altamente disordinato, ma anche della sua funzione nativa. Abbiamo ottenuto prove che la fosforilazione del poliQ-AR da parte della chinasi 2 ciclina-dipendente (CDK2) aumenta la tossicità, portando alla stabilizzazione e aggregazione del poliQ-AR. Inoltre, l'incrocio di mosche e topi SBMA con modelli in cui CDK2 è stato eliminato migliora il fenotipo SBMA. Per ottenere approfondimenti sul ruolo di questa fosforilazione, abbiamo eseguito un'analisi strutturale dei mutanti fosfomimetici e fosfodeficienti in questo sito, identificando le variazioni strutturali che portano a cambiamenti nella funzione di AR. Gli screening di chinasi e fosfatasi ci hanno permesso di stabilire

nuove reti proteiche che collegano la fosforilazione con la funzione. Queste osservazioni hanno un grande impatto sulla comprensione dei meccanismi molecolari con cui il poliQ-AR esercita la sua funzione tossica nei neuroni e in altri tessuti correlati alla malattia.

2016 Polanco MJ, Parodi S, Piol D, Stack C, Chivet M, Contestabile A, Miranda HC, Lievens PMJ, Espinoza S, Jochum T, Rocchi A, Grunseich C, Gainetdinov RR, Cato ACB, Lieberman A, La Spada AR, Sambataro F, Fischbeck KH, Gozes I, Pennuto M\*. CDK2 inhibition by PACAP/AC/PKA signaling reduces polyglutamine-expanded androgen receptor phosphorylation and toxicity in SBMA. *Sci Transl Med* 8:370ra181.

Malattia di Kennedy

Coordinator: Maria Pennuto

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2013

**Telethon Project (nr):**

TCP12013

**Disease Name:**

Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA)

**Keywords:**

Polyglutamine, androgen receptor, phosphorylation

## Poster P.04.27

### DEVELOPMENT OF A PREDICTIVE BODY FAT EQUATION FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY TYPE I CHILDREN

**Foppiani A.\*<sup>[1]</sup>**, De Amicis R.<sup>[1]</sup>, Leone A.<sup>[1]</sup>, Battezzati A.<sup>[1]</sup>, Ravella S.<sup>[1]</sup>, Bassano M.<sup>[1]</sup>, Bertini E.S.<sup>[3]</sup>, Baranello G.<sup>[4]</sup>, Pedemonte M.<sup>[5]</sup>, Agosto C.<sup>[6]</sup>, Masson R.<sup>[7]</sup>, Ester G.<sup>[8]</sup>, Mastella C.<sup>[9]</sup>, Bruno C.<sup>[5]</sup>, Bertoli S.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>ICANS, DeFENS, University of Milan ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>ICANS, DeFENS, University of Milan - IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Obesity Unit and Laboratory of Nutrition and Obesity Research, Department of Endocrine and Metabolic Diseases ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Unità di Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Laboratorio di Medicina Molecolare, Dipartimento di Neuroscienze e Neuroriabilitazione, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù ~ Roma ~ Italy, <sup>[4]</sup>The Dubowitz Neuromuscular Centre, UCL NIHR GOSH Biomedical Research Centre, Great Ormond Street Institute of Child Health - Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta" ~ London ~ United Kingdom, <sup>[5]</sup>Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[6]</sup>Pediatric Palliative Care - Pain Service, Department of Woman and Child Health, University of Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[7]</sup>Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta" ~ Milano ~ Italy, <sup>[8]</sup>Servizio di Dietetica e Nutrizione Aziendale, Dipartimento Cure Primarie, Servizio Sanitario Regionale Emilia Romagna, ASL Cesena ~ Cesena ~ Italy, <sup>[9]</sup>SAPRE, Dipartimento di Neuroscienze e di Salute Mentale, Fondazione IRCCS Cà Grande, Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milan ~ Italy

**Background.** Spinal muscular atrophy (SMA) patients have an altered body composition, with more fat mass (FM) and less fat free mass than their peers (Bertoli et al. 2017). Moreover, SMA patients shows an high prevalence of gastrointestinal disorders, ranging from dysphagia to constipation, usually requiring nutritional intervention (Mercuri et al. 2018).

The assessment of body composition in SMA it's important to plan nutritional intervention, potentially to track disease progression and to evaluate efficacy of new drugs. Dual energy X-ray absorptiometry (DXA) is an accurate method for the assessment of body composition, but it is not widely available. On the other hand, anthropometry is the most common technique for the assessment of body composition, but has not been validated with more accurate technique in SMA.

As part of our ongoing investigation on nutritional aspect in SMA, the aim of this study was to determine the most relevant and efficient anthropometric predictors of FM in SMA type 1 patients under 2 years of age.

**Methods.** The study was a cross-sectional cohort design conducted at the International Center for the Assessment of Nutritional status (ICANS), University of Milan. Study subjects were SMAI children (n = 118) recruited from 2 clinical referral centers for SMA in Italy (Developmental Neurology Unit, Carlo Besta Neurological Institute Foundation, Milan, and S.A.PRE., Early Abilitation Service, Mangiagalli e Regina Elena Hospital, Milan). Demographic (sex and age) and anthropometric (weight, length, segmental lengths, circumferences, skinfolds) data were examined as potential predictors of BF%.

**Results.** The median age of the sample (68 females, 50 males) was 7 (5;12) months. To account for lack of linearity, age was modeled as a linear spline with a knot at 12 months. Because of the many competing body measures, we used backward step-down variable selection to arrive to a parsimonious set of predictors. The resulting linear model equation achieved an adjusted R<sup>2</sup> index of 0.52 with the following coefficients and variables:

\* 0-12 months old:  $6.80 - 2.06 * \text{sex} + 0.35 * \text{age [month]} + 1.53 * \text{arm circumference [cm]} + 0.23 * \text{skinfolds sum [mm]}$

\* 13-24 months old:  $25.76 - 2.06 * \text{sex} - 1.23 * \text{age [month]} + 1.53 * \text{arm circumference [cm]} + 0.23 * \text{skinfolds sum [mm]}$

where sex = 0 for females, sex = 1 for males and skinfolds sum = biceps skinfold + triceps skinfold + subscapular skinfold + suprailiac skinfold.

Conclusions. Our model explained more than 50% variance of BF% from DXA with the use of basic demographic data and simple anthropometric measurements. Further research is necessary to improve predictive models of BF% in the SMA population and to test its validity and clinical application.

Sviluppo di una equazione predittiva per la massa grassa di bambini affetti da Atrofia Muscolare Spinale.

Introduzione. I pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale (SMA) sviluppano meno massa magra rispetto ad individui sani per il mancato sviluppo muscolare, e tendono ad accumulare più massa grassa, soprattutto in percentuale rispetto al loro peso corporeo. Oltre a questo, spesso necessitano di interventi nutrizionali a causa di disturbi gastrointestinali, come disfagia, reflusso e costipazione.

Alla base di qualsiasi intervento nutrizionale vi è lo studio della composizione corporea, ovvero della ripartizione del peso corporeo in massa magra e massa grassa. Per lo studio della composizione corporea esistono strumenti molto precisi e validi nella SMA, come assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA), che però sono difficilmente disponibili alla maggior parte dei pazienti. Altri strumenti molti diffusi, come l'antropometria, ad oggi non sono ancora stati resi validi nella SMA.

L'obiettivo di questo studio è stato di elaborare una equazione predittiva per la percentuale di massa grassa corporea di pazienti SMA 1 sotto i 2 anni di età, a partire da dati anagrafici e semplici misure antropometriche.

Metodi. Abbiamo arruolato 118 bambini grazie al contributo dell'istituto Carlo Besta di Milano e del centro S.A.PRE di Milano. I bambini sono stati visitati presso il centro ICANS di Milano, dove oltre alla DXA scan sono state raccolte misure antropometriche comprensive di peso, lunghezza, lunghezze segmentali, circonferenze e pliche.

Risultati. Sono state selezionate le variabili più rilevanti nella predizione della massa grassa ed elaborate due equazioni in base all'età del paziente:

\* per pazienti di 0-12 mesi:  $6.80 - 2.06 * \text{sezzo} + 0.35 * \text{età in mesi} + 1.53 * \text{circonferenza braccio in cm} + 0.23 * \text{somma pliche in mm}$

\* per pazienti di 13-24 mesi:  $25.76 - 2.06 * \text{sezzo} - 1.23 * \text{età in mesi} + 1.53 * \text{circonferenza braccio in cm} + 0.23 * \text{somma pliche in mm}$

dove sesso = 0 per le femmine, sesso = 1 per i maschi e somma pliche = plica bicipitale + plica tricipitale + plica sottoscapolare + plica sovrailiaca.

Conclusioni. Le nostre equazioni potrebbero essere un utile strumento per la valutazione della

composizione corporea di pazienti affetti da SMA 1 a partire da dati anagrafici di base e semplici misure antropometriche. Ulteriori studi sono necessari per verificare la bontà di queste equazioni e potenzialmente aumentare il potere predittivo.

Bertoli, Simona, Ramona De Amicis, Chiara Mastella, Giulia Pieri, Ester Giaquinto, Alberto Battezzati, Alessandro Leone, and Giovanni Baranello. 2017. "Spinal Muscular Atrophy, Types I and II: What Are the Differences in Body Composition and Resting Energy Expenditure?" *Clinical Nutrition* 36 (6): 1674–80. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.10.020>.

Mercuri, Eugenio, Richard S. Finkel, Francesco Muntoni, Brunhilde Wirth, Jacqueline Montes, Marion Main, Elena S. Mazzone, et al. 2018. "Diagnosis and Management of Spinal Muscular Atrophy: Part 1: Recommendations for Diagnosis, Rehabilitation, Orthopedic and Nutritional Care." *Neuromuscular Disorders* 28 (2): 103–15. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.11.005>.

Atrofia Muscolare Spinale

Coordinator: Simona Bertoli

Partners: Enrico Silvio Bertini, Giovanni Baranello, Marina Pedemonte, Caterina Agosto

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GUP15014

**Disease Name:**

Spinal Muscular Atrophy

**Keywords:**

spinal muscular atrophy, nutritional status, body composition



## Poster P.04.28

### IDENTIFICATION OF NEW DRUGGABLE TARGETS AND POTENTIAL THERAPEUTIC COMPOUNDS FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY, USING A C.ELEGANS MODEL OF NEURODEGENERATION

Santonicola P., Cieri F., La Rocca F., Gallotta I., Zampi G., Di Schiavi E.\*

*IBBR ~ NAPOLI ~ Italy*

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disorder characterized by the selective degeneration of lower spinal cord motor neurons (MNs), which leads to progressive muscle atrophy and death. SMA is caused by mutations of the Survival of Motor Neuron gene, *Smn1*, and although the genetic bases have been extensively studied, the molecular mechanisms underlying MNs death are still elusive. Two treatments have been recently approved: Nusinersen, that can redirect pre-mRNA splicing of a *SMN1* paralog, and Zolgensma, a gene therapy. However, both therapies have a very narrow therapeutic window, the complete rescue of the pathological phenotype is achieved only when the treatment is administered during the pre-symptomatic phase and the data are relatively sparse on drug efficacy for types III and IV SMA. Therefore, a comprehensive whole-lifespan therapeutic approach that comprises symptomatic cases and all clinical phenotypes is needed, involving also *SMN*-independent strategies. In the absence of a specific molecular target, chemical and genetic screens can be performed using small model systems that can, at the same time, elucidate the molecular basis of the disease and identify potential therapeutic compounds. *C. elegans* represents one of these valuable model organisms for human diseases, since its genome encodes many human disease orthologs and the biological processes are well conserved. Importantly, the use of *C.elegans* allows to strongly reduce the number of vertebrate animals used, in compliance with Italian and international guidelines, fulfilling the 3Rs principles (Replacing the use of mammals; Reducing the number of mammals used to a minimum; Refining the way experiments are carried out). We developed an innovative genetic model, which enabled us to efficiently reduce the function of *smn-1* gene, the *C.elegans* homolog of *Smn1*, specifically in MNs. Our results provide strong evidence that this is a powerful and unique tool to study SMA, that allows both the study of the neurodegeneration process in vivo and the test of new therapeutics (Gallotta et al., 2016). Using this model we discovered that *WDR79/TCAB-1* and *SYNCRIP/HRP-2*, genetically interacts in vivo with *Smn1*, in different model species (Di Giorgio et al., 2017; Rizzo et al., 2019). Moreover we successfully used this model for unbiased genetic and drug screenings, so that we identified twenty suppressor mutants and a natural extract being able to rescue the neurodegeneration in worms (De Carlos Cáceres et al., 2018; Mazzarella et al., 2019). We are now using genetic manipulations, drug treatments and phenotypic analysis to identify the genetic loci affected in the twenty suppressor mutants retrieved from the screening and the molecule in the natural extract capable of rescuing *SMN* function. Data gathered will be translated in the third year of the project into a mammalian model to refine future strategies for restoring MNs functionality in patients.

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia caratterizzata dalla degenerazione selettiva dei motoneuroni del midollo spinale, che porta alla progressiva atrofia muscolare e morte dei pazienti. La SMA è causata da mutazioni nel gene *Smn1* e sebbene le basi genetiche siano state ampiamente studiate, i meccanismi molecolari che causano la morte dei motoneuroni sono ancora ignoti. Due trattamenti *SMN*-dipendenti sono stati recentemente approvati: Nusinersen e Zolgensma. Tuttavia,

entrambe le terapie hanno una finestra terapeutica molto ristretta, il completo recupero del fenotipo patologico si ottiene solo quando il trattamento viene somministrato durante la fase pre-sintomatica e i dati sono relativamente scarsi sull'efficacia per i pazienti con SMA III e IV. Pertanto, è necessario un approccio terapeutico globale che comprenda anche i casi sintomatici e tutti i fenotipi clinici, anche utilizzando strategie SMN-indipendenti. In assenza di un target molecolare specifico, è possibile eseguire screening chimici e genetici utilizzando piccoli sistemi modello, che possono, allo stesso tempo, chiarire le basi molecolari della malattia e permettere l'identificazione di potenziali composti terapeutici. *C. elegans* rappresenta uno di questi organismi modello utili allo studio delle malattie umane, poiché il suo genoma codifica per molti geni simili a quelli responsabili di malattie umane ed i processi biologici sono ben conservati. Inoltre l'uso di *C. elegans* consente di ridurre fortemente il numero di mammiferi utilizzati, in conformità con le linee guida italiane e internazionali, soddisfacendo i principi delle 3R (sostituzione dell'uso dei mammiferi; riduzione al minimo del numero di mammiferi utilizzati; perfezionamento del modo in cui vengono eseguiti gli esperimenti). A tal fine abbiamo sviluppato un modello genetico che ci ha permesso di ridurre efficacemente la funzione del gene *smn-1*, omologo in *C. elegans* di *Smn1*. I nostri risultati suggeriscono che il nostro modello è uno strumento potente e unico per studiare la SMA, che consente lo studio del processo di neurodegenerazione in vivo (Gallotta et al., 2016). Usando questo modello abbiamo scoperto che *WDR79* e *SYNCRIP* interagiscono geneticamente in vivo con *Smn1*, in diverse specie modello (Di Giorgio et al., 2017; Rizzo et al., 2019). Inoltre abbiamo usato con successo questo modello per uno screening genetico ed uno farmacologico, che ci hanno permesso di identificare venti mutanti e un estratto naturale in grado di ridurre la neurodegenerazione (De Carlos Cáceres et al., 2018; Mazzarella et al., 2019). Ora stiamo usando analisi genetiche, trattamenti farmacologici e osservazioni fenotipiche per identificare i venti loci genetici e la molecola contenuta nell'estratto naturale, che modificano la funzione di SMN. I dati raccolti saranno tradotti nel terzo anno del progetto in un modello di mammifero per definire nuove strategie volte a ripristinare la funzionalità dei neuroni nei pazienti con SMA.

-De Carlos Cáceres, I., Porto, D. A., Gallotta, I., Santonicola, P., Rodríguez-Cordero, J., Di Schiavi, E., et al. (2018). Automated screening of: *C. Elegans* neurodegeneration mutants enabled by microfluidics and image analysis algorithms. *Integr Biol (United Kingdom)*. doi:10.1039/c8ib00091c.

-Di Giorgio, M. L., Esposito, A., Maccallini, P., Micheli, E., Bavasso, F., Gallotta, I., et al. (2017). *WDR79/TCAB1* plays a conserved role in the control of locomotion and ameliorates phenotypic defects in SMA models. *Neurobiol Dis* 105. doi:10.1016/j.nbd.2017.05.005.

-Gallotta, I., Mazzarella, N., Donato, A., Esposito, A., Chaplin, J. C., Castro, S., et al. (2016). Neuron-specific knock-down of *SMN1* causes neuron degeneration and death through an apoptotic mechanism. *Hum Mol Genet* 25, 2564–2577. doi:10.1093/hmg/ddw119.

-Mazzarella, N., Giangrieco, I., Visone, S., Santonicola, P., Achenbach, J., Zampi, G., et al. (2019). Green kiwifruit extracts protect motor neurons from death in a spinal muscular atrophy model in *Caenorhabditis elegans*. *Food Sci Nutr*. doi:10.1002/fsn3.1078.

-Rizzo, F., Nizzardo, M., Vashisht, S., Molteni, E., Melzi, V., Taiana, M., et al. (2019). Key role of *SMN/SYNCRIP* and *RNA-Motif 7* in spinal muscular atrophy: RNA-Seq and motif analysis of human motor neurons. *Brain*. doi:10.1093/brain/awy330.

## Atrofia Muscolare Spinale

Coordinator: Elia Di Schiavi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16203

**Disease Name:**

Spinal Muscular Atrophy

**Keywords:**

Neurodegeneration, C.elegans, Genetic and drug screenings

## Poster P.04.29

### CELL PENETRATING PEPTIDE-CONJUGATED MORPHOLINO FOR TREATMENT OF SMA SYMPTOMATIC CASES

Pagliari E.<sup>[1]</sup>, Rizzuti M.<sup>[2]</sup>, Bersani M.<sup>[1]</sup>, Ramirez A.<sup>[1]</sup>, Bordoni A.<sup>[2]</sup>, Taiana M.<sup>[1]</sup>, Bresolin N.<sup>[1]</sup>, Comi G.P.<sup>[1]</sup>, Corti S.<sup>[1]</sup>, Nizzardo M.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dino Ferrari Centre, Neuroscience Section, Department of Pathophysiology and Transplantation (DEPT), University of Milan, Neurology Unit, IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milan ~ Italy

Background: Nusinersen, like other treatments tested for SMA, has a very narrow therapeutic window (Chiriboga, 2017, Corey, 2017); results are strikingly efficient only in the pre- or early symptomatic phases, likely because ASOs have difficulty crossing the blood-brain barrier (BBB), and cellular uptake is inefficient. The conjugation of ASO with cell-penetrating peptides (CPPs) can be a strategy to address this issue; indeed, it has already been proved to enhance ASO cellular and tissue uptake and pharmacological profiles (Amantana et al., 2007). In our previous study we demonstrated, in presymptomatic affected mice, the therapeutic efficacy of a Morpholino (MO) sequence, an ASO variant (Nizzardo et al., 2014). Here, we tested the therapeutic efficacy of four different CPPs conjugated to our validated MO sequence in presymptomatic and symptomatic SMA mice.

Results: We linked four different CPPs (Tat, R6, r6 and (RXRRBR)2XB) to our already validated MO sequence (Nizzardo et al., 2014). Our first aim was to identify the best peptides able to deliver the MO to the central nervous system (CNS) through a local or systemic injection performed both in presymptomatic and symptomatic mice in comparison to unconjugated-MO. The therapeutic potential of conjugates was determined by the ability to rescue the SMN protein levels. Data from western blot analysis on brain and spinal cord samples showed that all the CPP-MO conjugates increase SMN protein levels more efficiently than unconjugated MO in all conditions. Interestingly, systemic injection is the most successful treatment underlying the ability of the conjugates to cross the BBB, allowing MO non-invasive systemic delivery. The most promising candidates seemed to be r6-MO and RXR-MO, which were selected for further investigations to assess the therapeutic efficacy in a larger cohort of SMA mice. The two conjugates were administered in symptomatic SMA $\Delta$ 7 mice intraperitoneally at postnatal day 5. Spinal cord and intercostal muscles of SMA treated mice showed a significant increase in the number of motor neurons and in the innervated neuromuscular junctions. These data were supported by a striking increase in survival and motor functions. All the results confirmed the superiority of the conjugates, in particular r6-MO, on unconjugated MO.

Conclusion: The conjugation of MO with CPP is able to improve MO biodistribution and increase SMN protein levels representing a viable tool for SMA therapy. In particular, we identified two CPPs, r6 and RXR, that could efficaciously deliver MO into the CNS after an intraperitoneal, symptomatic injection in affected mice. CPP-MOs had significant, beneficial effects on the symptomatic pathological phenotype never observed with other compounds. Overall, this strategy offers the chance to treat the disease in a symptomatic phase, expanding the therapeutic window and can be further optimized and developed for SMA clinical trials.

Titolo in italiano: Morfolino coniugato a peptide per il trattamento dei casi sintomatici affetti da SMA  
Abstract per il pubblico laico (italiano)

La terapia mediante oligonucleotidi antisenso (ASO), oltre alla terapia genica, è l'unico trattamento, approvato per l'atrofia muscolare spinale (SMA). La SMA è causata da mutazioni nel gene SMN, associate ad un deficit dell'omonima proteina. Nel nostro laboratorio abbiamo già dimostrato che il Morfolino (MO), una variante di ASO, è in grado di aumentare la produzione di SMN e di migliorare il fenotipo patologico del modello murino di SMA. Tuttavia, l'efficacia terapeutica è fortemente limitata dall'inadeguata biodistribuzione e dalla scarsa efficacia nei casi sintomatici. Ad oggi, il recupero completo del fenotipo patologico in vivo è stato ottenuto solo in fase presintomatica, che raramente corrisponde al momento in cui viene fatta la diagnosi nei pazienti. Una possibile strategia consiste nel coniugare il MO con peptidi in grado veicolarlo nel sistema nervoso centrale (SNC), oltrepassando la barriera emato-encefalica (BEE) e migliorandone la biodistribuzione. Inoltre, questo approccio offre la possibilità di trattare la malattia in fase sintomatica, quando la BEE ha ormai raggiunto la maturazione completa, ampliando la finestra terapeutica. **RISULTATI:** Abbiamo studiato l'efficacia di 4 diversi peptidi nel veicolare il MO nel SNC. Abbiamo coniugato i peptidi al MO e li abbiamo somministrati per via sistemica, valutando il loro potenziale terapeutico in termini di capacità di incrementare i livelli di SMN. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'efficacia di tutti i peptidi ed in particolare la superiorità di due coniugati, che sono stati testati in topi SMA sintomatici. I dati funzionali e di sopravvivenza hanno confermato l'efficacia del trattamento. **PROSPETTIVE:** I nostri dati hanno rivelato che il MO coniugato a dei peptidi è in grado di raggiungere il SNC dopo somministrazione sistemica e di curare il fenotipo patologico. Questa strategia offre la possibilità di trattare la SMA in fase sintomatica e potrebbe essere ulteriormente ottimizzata per future sperimentazioni cliniche.

-Amantana A, Moulton HM, Cate ML, Reddy MT, Whitehead T, Hassinger JN, Youngblood DS, Iversen PL. Pharmacokinetics, biodistribution, stability and toxicity of a cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugate. *Bioconjug Chem.* 2007 Jul-Aug;18(4):1325-31.

-Chiriboga CA. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2017. 17(10): 955-962.

-Corey DR. Nusinersen, an antisense oligonucleotide drug for spinal muscular atrophy. *Nature Neuroscience.* 2017; 20: 497–499.

-Nizzardo M, et al. Effect of combined systemic and local morpholino treatment on the spinal muscular atrophy Δ7 mouse model phenotype. *Clinical Therapeutics.* 2014 Mar 1;36(3):340-56.e5.

## Atrofia Muscolare Spinale

Coordinator: Monica Nizzardo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

### **Telethon Project (nr):**

GGP14025

### **Disease Name:**

Spinal Muscular Atrophy

### **Keywords:**

Spinal Muscular Atrophy, Morpholino antisense oligonucleotides, peptides

## Poster P.04.30

### ANTHROPOMETRIC STANDARDS IN NAÏVE PATIENTS WITH SPINAL MUSCULAR ATROPHY TYPE 1.

**De Amicis R.\*<sup>[1]</sup>**, Foppiani A.<sup>[1]</sup>, Leone A.<sup>[1]</sup>, Bedogni G.<sup>[1]</sup>, Ravella S.<sup>[1]</sup>, Mastella C.<sup>[2]</sup>, Baranello G.<sup>[3]</sup>, Masson R.<sup>[4]</sup>, Bertini E.S.<sup>[5]</sup>, D'Amico A.<sup>[5]</sup>, Pedemonte M.<sup>[6]</sup>, Bruno C.<sup>[6]</sup>, Agosto C.<sup>[7]</sup>, Giaquinto E.<sup>[8]</sup>, Bassano M.<sup>[8]</sup>, Battezzati A.<sup>[1]</sup>, Bertoli S.<sup>[9]</sup>

<sup>[1]</sup>International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS), Department of Food Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), University of Milan ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>SAPRE-UONPIA, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>The Dubowitz Neuromuscular Centre, UCL NIHR GOSH Biomedical Research Centre, Great Ormond Street Institute of Child Health ~ London ~ United Kingdom, <sup>[4]</sup>Developmental Neurology Unit, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta ~ Milan ~ Italy, <sup>[5]</sup>Department of Neurosciences, Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders Unit, Laboratory of Molecular Medicine, Bambino Gesù Children's Research Hospital, IRCCS ~ Rome ~ Italy, <sup>[6]</sup>Italian Department of Neurosciences and Rehabilitation, Institute "G. Gaslini" ~ Genoa ~ Italy, <sup>[7]</sup>Department of Women's and Children's Health, University of Padua ~ Padua ~ Italy, <sup>[8]</sup>Dietetic and Nutrition Center, M. Bufalini Hospital ~ Cesena ~ Italy, <sup>[9]</sup>IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Obesity Unit and Laboratory of Nutrition and Obesity Research, Department of Endocrine and Metabolic Diseases - Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, University of Milan ~ Milan ~ Italy

Patients with spinal muscular atrophy type 1 (SMA1) suffer from neuromuscular, respiratory and gastrointestinal problems that, associated with an absent physical activity, can influence energy needs, as well as energy intake, with a consequent effect on growth pattern. Currently, the recent advent of new drugs and clinical trials for SMA is changing the course of the disease, making the clinical and nutritional aspects even more important in order to improve the quality of life. In this scenery, the availability of nutritional standards during the disease is useful for understanding the effect of new treatments, but consistent data are scarce. The aim of this study was to provide a picture of the nutritional status and growth pattern of SMA1 children before pharmaceutical clinical trials experience.

The nutritional status of 106 SMA1 children (57.5% females and 42.5% males, median age: 8 months, interquartile range (IQR): 6 – 24 months) were measured by anthropometrical measurements (weight, length, arm circumference and skinfolds) before entering in one of the clinical trials, according to a standardized protocol previously published (Bertoli et al. 2019). WHO and CDC growth charts were used as reference values for length, weight and BMI of children who were younger than 2 and older than 2 years old, respectively. The amount of fat mass by skinfolds (FM) and the arm muscular area (AMA) were compared with those of healthy children using the reference value proposed by Fomon and Frisancho, respectively.

Of the 106 children, 25.7% used a noninvasive ventilation and 12.4% was tracheostomized, 24.5% was fed through a percutaneous endoscopic gastrostomy. 35.8% of children had a body weight below the 5th percentile. On the other hand, 42.5% of children had a body length above the 85th percentile. Consequently, the BMI of 68.9% of children was below the 5th percentile, and only 29.2% of children had a BMI ranged between 5th and 85th percentile. The prevalence of malnutrition did not change with increasing age ( $p=0.394$ ).

Concerning FM and AMA, the median values of FM (kg), FM (%) and AMA (cm<sup>2</sup>) were 2.8 kg (IQR:

2.4 – 3.6 kg), 37.7% (IQR: 33.0% – 37.7%) and 7.8 cm<sup>2</sup> (IQR: 6.6 – 9.2 cm<sup>2</sup>), respectively. Compared to healthy peers with same sex and age, SMA1 children had an increment of 55% (interquartile range: 42.6% – 81.9%) of FM, and AMA resulted below the 5th percentile in the 75.0% of cases.

These data show that SMA1 children have a different growth pattern and a different body composition compared to children of general population. For this reason, the use of healthy children as control group presents several limitations because of the peculiar nature of SMA disease. Therefore, these data will be particularly useful as standards for future studies aimed to evaluate the effects of pharmaceutical clinical trials on nutritional status and growth pattern of SMA1 children.

## STANDARD DI CRESCITA IN PAZIENTI AFFETTI DA ATROFIA MUSCOLARE SPINALE DI TIPO 1.

I bambini affetti da atrofia muscolare spinale di tipo 1 (SMA1) soffrono di problemi neuromuscolari, respiratori e gastrointestinali che, associati ad un'attività fisica assente, possono influenzare il fabbisogno energetico, nonché l'assunzione di energia, con un conseguente effetto sullo stato di accrescimento. Attualmente, il recente avvento di nuovi farmaci e sperimentazioni cliniche per la SMA sta cambiando il decorso della malattia, rendendo gli aspetti clinici e nutrizionali ancora più importanti per migliorare la qualità della vita. In questo scenario, la disponibilità di standard nutrizionali durante la malattia è utile per comprendere l'effetto dei nuovi trattamenti, ma i dati attuali sono scarsi. Lo scopo di questo studio è stato fornire un quadro dello stato nutrizionale e del modello di crescita dei bambini SMA1 prima dell'avvento dei farmaci.

Lo stato nutrizionale di 106 bambini SMA1 (57,5% femmine e 42,5% maschi, età media: 8 mesi, intervallo interquartile (IQR): 6 - 24 mesi) è stato misurato con misurazioni antropometriche (peso, lunghezza, circonferenza del braccio e spessori di grasso sottocutanei), secondo un protocollo standardizzato specifico per la SMA (Bertoli et al. 2019). Le tabelle di crescita standard della popolazione generale sono state utilizzate come valori di riferimento per lunghezza, peso e indice di massa corporea (IMC) di bambini di età inferiore ai 2 anni e superiore ai 2 anni, rispettivamente. La quantità di massa grassa e l'area muscolare del braccio sono state confrontate con quelle dei bambini sani.

Dei 106 bambini, il 25,7% utilizzava ventilazione non invasiva e il 12,4% era tracheostomizzato, il 24,5% era alimentato tramite gastrostomia endoscopica percutanea. Il 35,8% dei bambini aveva un peso corporeo inferiore al 5° percentile e il 42,5% dei bambini aveva una lunghezza corporea superiore all'85° percentile. Di conseguenza, il 68,9% dei bambini è risultato sottopeso, e solo il 29,2% normopeso. La prevalenza di sottopeso non cambiava con l'aumentare dell'età.

Per quanto riguarda la massa grassa e l'area muscolare del braccio, rispetto ai coetanei sani dello stesso sesso e della stessa età, i bambini SMA1 hanno riportato un incremento del 55% di massa grassa, e il 75% dei bambini ha riportato un'area muscolare al di sotto del 5° percentile.

Questo studio fornisce una mappa della prevalenza di malnutrizione tra i bambini SMA1 e fornisce dati particolarmente utili per valutare gli effetti dei farmaci attualmente disponibili e studiati sullo stato nutrizionale e sul modello di crescita dei bambini SMA1.

Bertoli S & Foppiani A, De Amicis R, Leone A, Mastella C, Bassano M, Giaquinto E, Baranello G, Battezzati A. Anthropometric measurement standardization for a multicenter nutrition survey in children with spinal muscular atrophy. Eur J Clin Nutr. 2019 Jan 15. doi: 10.1038/s41430-019-0392-2.

Atrofia Muscolare Spinale di tipo 1

Coordinator: Simona Bertoli

Partners: Enrico Silvio Bertini, Giovanni Baranello, Marina Pedemonte, Caterina Agosto

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GUP15014

**Disease Name:**

Spinal Muscular Atrophy Type 1

**Keywords:**

spinal muscular atrophy type 1, nutritional status, anthropometric standards



## 05\_Genetic neurological disorder\Polyneuropathies

## Poster P.05.31

### **KNOCKDOWN AND REPLACEMENT OF MFN2 FOR TREATMENT OF DOMINANTLY INHERITED PERIPHERAL NEUROPATHY CMT2A PATIENTS**

Rizzo F., Nizzardo M., Salani S., Melzi V., Taiana M., Bresolin N., Comi G.P., Corti S.\*

*Dino Ferrari Centre, Neuroscience Section, Department of Pathophysiology and Transplantation (DEPT), University of Milan, Neurology Unit, IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy ~ Milan ~ Italy*

**Background/Rationale:** Charcot-Marie-Tooth Disease 2A (CMT2A), the most common form of CMT2, is a severe and disabling sensory-motor axonopathy that currently lacks a cure. It is caused by autosomal dominant mutations in the MFN2 gene (Zuchner et al., 2004; Griffin et al., 2006; de Brito and Scorrano, 2008; Feely et al., 2011). **Specific aims:** The overall objective is to define whether silencing mutant MFN2 via RNA interference (RNAi) in combination with gene replacement therapy (GRT) with wild-type (wt)-MFN2 is an effective therapeutic strategy for CMT2A. In vitro validation and in vivo translation in reliable disease models is crucial to addressing this question. **AIM1:** Generate and validate a new vector carrying both the RNAi and GRT systems for MFN2. We will generate a single vector that co-expresses RNAi (short hairpin (sh)-RNA) targeting MFN2 transcripts for degradation and RNAi-resistant wt-MFN2 cDNA (AAV9-shRNA-MFN2 vector). These sequences will be tested in induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived motor neurons (MNs; Rizzo et al., 2016), and then packaged into adeno-associated virus 9 (AAV9) for in vivo testing. **AIM2:** Assess the therapeutic efficacy of AAV9-shRNA-MFN2 vector in an established CMT2A mouse model (MitoCharc1). We will evaluate the efficacy of MFN2-targeting RNAi/GRT in an existing CMT2A model (MitoCharc1, Cartoni et al., 2010). Specifically, we will administer AAV9-shRNA-MFN2 vector within the central nervous system (CNS) of adult mice by intrathecal injection (Meyer et al., 2009), analyzing the effect on phenotypic and neuropathological disease features (Cartoni et al., 2010). **AIM3:** Test the AAV9-shRNA-MFN2 vector in newly generated preclinical mouse models. In order to study our approach in models with other CMT2A mutations or more severe phenotypes, we will generate mouse models by transferring CMT2A patient mutations to wt or MitoCharc1 mice using AAV9 and evaluate our strategy in these new models. **Anticipated output:** Our approach could be the first effective treatment for CMT2A and will have a broad translational impact on other genetic neuromuscular disorders.

**Titolo:**

Silenziamento e ri-espressione del gene MFN2 come trattamento per i pazienti affetti da CMT2A, una neuropatia periferica ereditaria

**Abstract per il pubblico laico in italiano:**

La malattia di Charcot-Marie-Tooth 2A (CMT2A), la forma più comune di CMT2, è una neuropatia sensitivo-motoria grave e disabilitante, attualmente priva di cura. È causata da mutazioni autosomiche dominanti nel gene MFN2. L'obiettivo di questo studio è sviluppare un approccio terapeutico per questa patologia basato sul silenziamento del gene MFN2 patologico in combinazione con la somministrazione del gene MFN2 normale. Questa strategia terapeutica sarà opportunamente validata in modelli in vitro e in vivo della malattia. Il nostro approccio potrebbe rappresentare il primo trattamento efficace per la CMT2A e avere un ampio impatto traslazionale su altri disturbi neuromuscolari a componente genetica.

Cartoni R, Arnaud E, Médard JJ, Poirot O, Courvoisier DS, Chrast R, Martinou JC. Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain*. 2010 May;133(Pt 5):1460-9.

de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008 Dec 4;456(7222):605-10.

Feely SM, Laura M, Siskind CE, Sottile S, Davis M, Gibbons VS, Reilly MM, Shy ME. MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology*. 2011 May 17;76(20):1690-6.

Griffin EE, Detmer SA, Chan DC. Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1763(5-6):482-9. Meyer K, Ferraiuolo L, Schmelzer L, Braun L, McGovern V, Likhite S, Michels O, Govoni A, Fitzgerald J, Morales P, Foust KD, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK. Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. *Mol Ther*. 2015 Mar;23(3):477-87.

Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 2004 May;36(5):449-51.

Malattia di Charcot Marie Tooth di tipo 2A

Coordinator: Stefania Corti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2020

**Telethon Project (nr):**

GGP19002

**Disease Name:**

Charcot Marie Tooth Disease 2A

**Keywords:**

Gene therapy, MFN2, CMT2A

## Poster P.05.32

### TTR-FAP ITALIAN REGISTRY: A COLLABORATIVE NETWORK FOR DEFINITION OF NATURAL HISTORY, PSYCHOSOCIAL BURDEN, STANDARDS OF CARE AND CLINICAL TRIALS

Vita G.<sup>[1]</sup>, Obici L.<sup>[2]</sup>, Merlini G.<sup>[2]</sup>, Rapezzi C.<sup>[3]</sup>, Magliano L.<sup>[4]</sup>, Sabatelli M.<sup>[5]</sup>, Grandis M.<sup>[6]</sup>, Fabrizi G.M.<sup>[7]</sup>, Pareyson D.<sup>[8]</sup>, Santoro L.<sup>[9]</sup>, Mauro A.<sup>[10]</sup>, Gentile L.<sup>[1]</sup>, Russo M.<sup>[1]</sup>, Mazzeo A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Unit of Neurology and Neuromuscular Diseases, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Messina ~ Messina ~ Italy, <sup>[2]</sup>Amyloidosis Research and Treatment Centre, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo ~ Pavia ~ Italy, <sup>[3]</sup>Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, Alma Mater Studiorum University of Bologna ~ Bologna ~ Italy, <sup>[4]</sup>Department of Psychology, University of Campania 'Luigi Vanvitelli' ~ Caserta ~ Italy, <sup>[5]</sup>Institute of Neurology-Catholic University of Sacro Cuore, Clinic Center NEMO- Fondazione Pol. A. Gemelli IRCCS ~ Rome ~ Italy, <sup>[6]</sup>Department of Neuroscience Rehabilitation Ophthalmology Genetics, Maternal and Child Health (DiNOGMI), University of Genova ~ Genova ~ Italy, <sup>[7]</sup>Neurology Division, Department of Neuroscience AOU Verona ~ Verona ~ Italy, <sup>[8]</sup>Unit of Rare Neurodegenerative and Neurometabolic Diseases, Department of Clinical Neurosciences, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta ~ Milan ~ Italy, <sup>[9]</sup>University of Naples 'Federico II' ~ Napoli ~ Italy, <sup>[10]</sup>Department of Neurosciences, University of Turin ~ Turin ~ Italy

Familial amyloid polyneuropathy (FAP) associated with mutations in the transthyretin (TTR) gene is the most common form of genetic amyloidosis. It is a progressive devastating disease transmitted as an autosomal dominant trait, with fatal outcome occurring within ten years after inaugural symptoms<sup>1</sup>. This project was planned to create an Italian TTR-FAP registry with the aims to improve understanding of genotype-phenotype relationship, differences in disease presentation, diagnosis and course including inter- and intra-mutation variability, providing a national forum to collect motor outcome measures, patient-reported outcomes and psychosocial burden.

To date, 442 subjects are in the registry. They are 259 symptomatic patients and 183 asymptomatic carriers of TTR pathologic mutation. Subjects in the registry carries 32 different TTR mutations. The most frequent are Leu68 (23%), Met30 (21%), Leu64 (20%), Gln89 (11%) and Ile122 (7.5%), including more than 85% of patients. Except for Met30 that is diffused worldwide, other mutations have a peculiar geographical distribution.

Clinical involvement is different and could be mainly cardiac, neurological or with a marked dysautonomia. The age of onset is frequently late, Ile122, Leu64, Phe68 and Leu68 having a mean age at onset >60 yrs. The mutations with the earliest onset are Ala49 and Gln89, with a mean age at onset 44.3 (range 30-55) and 50 (range 30-70) respectively. The mean diagnostic delay is 3.2 yrs (range 0-13). The prevalence of the disease is 4.4/1,000,000 with some regions reaching 10/million. CIDP and lumbar spinal stenosis are the most commonly reported misdiagnosis. A pilot study revealed validity of 6MWT in monitoring FAP<sup>2</sup>.

124 patients and 59 caregiving relatives were evaluated for practical and psychological difficulties (M: 74%, 24%; mean age: 66, 57 yrs; 78% spouses; not employed/retired 73%, 50%, respectively). 36% of patients need help for walking, 46% move to have therapies. Practical difficulties most often reported as always/often present: in recreational activities (55%, 32%), in going on holiday (43%, 40%), in work/household activities (43%, 15%); psychological: feeling of loss (46% and 60%), worries for the future (44% and 40%), and loneliness in dealing with the disease (43% and 47%).

The number of patients enrolled determinate a higher prevalence than other well studied countries such as France and Japan<sup>3,4</sup>. It is still higher than previous reported prevalence in Italian regions<sup>5</sup>. The high number of different mutations and phenotypes reported is peculiar, and make reasonable

that the prevalence of the disease is still underestimated. Our data confirm that mutation with a cardiac phenotype, such as Leu68 and Ile122 are relatively common, despite the late-onset. Almost all patients with cardiac mutation are from two regions (Emilia Romagna and Toscana). Clinical data analysis are ongoing and will permit to better define the progression of the disease in a 12 months period.

## POLINEUROPATIA AMILOIDOSICA FAMILIARE, TRANSTIRETINA, STORIA NATURALE, CARICO PSICOSOCIALE, STANDARD DI CURA, BISOGNI DI CURA

La polineuropatia amiloidosica familiare da transtiretina è una malattia progressiva che colpisce prevalentemente il sistema nervoso periferico, il sistema nervoso vegetativo e il cuore, a esordio in età adulta (tra terza e ottava decade). Si tratta di una forma di amiloidosi: appartiene quindi a un gruppo di malattie caratterizzate da alterazioni in alcune proteine che tendono ad aggregarsi formando fibrille amiloidi. La malattia è dovuta a mutazioni del gene TTR ed è trasmessa con modalità autosomica dominante: un genitore con la mutazione ha una probabilità su due di trasmettere la malattia a ciascuno dei propri figli. La diagnosi si basa sull'obiettività clinica ed un'attenta raccolta anamnestica, seguite dall'analisi genetica.

Fino a pochi anni fa l'unico trattamento era rappresentato dal trapianto di fegato, eseguibile però solo in alcune categorie di pazienti. Recentemente molecole stabilizzanti della TTR o che ne riducono la sintesi fino all'80 - 90 % si sono rivelati efficaci nel rallentare e financo bloccare la progressione della malattia.

Il registro italiano per la TTR-FAP

Questo progetto aveva lo scopo di creare un Registro Nazionale TTR-FAP, dove sono raccolte informazioni cliniche e genetiche dei pazienti affetti da TTR-FAP. I pazienti vengono valutati con scale e strumenti già validati o da validare per quanto riguarda il coinvolgimento neurologico, cardiologico e psicologico. Ad oggi sono stati arruolati 442 soggetti di cui 259 pazienti e 183 carriers asintomatici.

Stiamo ottenendo dati epidemiologici sulla prevalenza Italiana della malattia (attualmente risulta essere 4,4/1.000.000 ma potrebbe ancora essere sottostimata), sulla storia naturale, sugli standard di cura, sul carico e sui bisogni dei pazienti che faciliteranno la fattibilità e la progettazione di futuri studi terapeutici.

Il registro sta inoltre fornendo informazioni sugli aspetti clinici ai quali prestare attenzione in fase precoce, sui diversi sintomi di esordio e sulle età alle quali è facile aspettarsi l'inizio della sintomatologia nelle diverse forme.

Sono stati inoltre valutate le difficoltà pratiche e psicologiche di 124 pazienti e 59 familiari (rispettivamente, M: 74%, 24%; età media: 66, 57 anni; 78% coniugi; non occupati/pensionati 73%, 50%). 36% dei pazienti ha bisogno di aiuto per muoversi, 46% per le terapie. Difficoltà pratiche più spesso riportate come presenti sempre/spesso: nelle attività ricreative (55%, 32%), nell'andare in vacanza (43%, 40%), nelle attività lavorative/domestiche (43%, 15%); psicologiche: senso di perdita (46% e 60%), preoccupazione per il futuro (44% e 40%), solitudine nell'affrontare la patologia (43% e 47%).

Sono in corso di analisi i dati clinici riguardanti il decorso della malattia nell'arco di 12 mesi.

1. Vita G et al. Genetic neuromuscular disorders: living the era of a therapeutic revolution. Part 1: peripheral neuropathies. *Neurol Sci.* 2019 Apr;40(4):661-669
2. Vita GL et al. A. 6MWT performance correlates with peripheral neuropathy but not with cardiac involvement in patients with hereditary transthyretin amyloidosis (hATTR). *Neuromuscul Disord.* 2019

Mar;29(3):213-220.

3. Adams D et al. Regional difference and similarity of familial amyloidosis with polyneuropathy in France. *Amyloid*. 2012 Jun;19 Suppl 1:61-4.

4. Kato-Motozaki Y et al. Epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in Japan: Identification of a novel endemic focus. *J Neurol Sci*. 2008;270(1-2):133-40.

5. Mazzeo A et al. Transthyretin-Related Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP): A Single-Center Experience in Sicily, an Italian Endemic Area. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2 (2015) S39–S48

Polineuropatia amiloidosica familiare

Coordinator: Giuseppe Vita

Partners: Giampaolo Merlini, Lorenza Magliano, Mario Sabatelli, Marina Grandis, Gian Maria Fabrizi, Davide Pareyson, Lucio Santoro, Alessandro Mauro

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GUP15010

**Disease Name:**

Familial Amyloidotic Polyneuropathy

**Keywords:**

TTR-FAP, Italian Registry, Epidemiology

## 06\_Genetic neurological disorder

## Poster P.06.33

### FINDING NEW TARGETS TO COUNTERACT BRAIN PROGENITOR CELLS DYSREGULATION IN AGC1 DEFICIENCY HYPOMYELINATION: A MULTIDISCIPLINARY APPROACH.

Poeta E.<sup>[1]</sup>, Petralla S.<sup>[1]</sup>, Bentivoglia M.<sup>[1]</sup>, Virgili M.<sup>[1]</sup>, Tartagni O.<sup>[1]</sup>, Fiermonte G.<sup>[2]</sup>, Pisano I.<sup>[2]</sup>, Porcelli V.<sup>[2]</sup>, Giorgi F.<sup>[1]</sup>, Mercolini L.<sup>[1]</sup>, Pinton P.<sup>[3]</sup>, Hentschel J.<sup>[4]</sup>, Lasorsa F.M.<sup>[5]</sup>, Monti B.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Alma mater studiorum – Università degli studi di Bologna ~ Bologna ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Dipartimento Di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli studi di Bari “Aldo Moro” ~ Bari ~ Italy,

<sup>[3]</sup>Dipartimento di Morfologia, chirurgia e medicina sperimentale, Università degli Studi di Ferrara ~ Ferrara ~ Italy,

<sup>[4]</sup>Institut für Humangenetik, University of Leipzig ~ Leipzig ~ Germany, <sup>[5]</sup>Consiglio Nazionale delle Ricerche - CNR, Istituto di Biomembrane, Bioenergetica e Biotecnologie Molecolari (IBIOM) ~ Bari ~ Italy

AGC1 deficiency (EIEE39, OMIM 612949) is a rare genetic disease leading to a severe encephalopathy in early childhood, caused by mutations in SLC25A12 gene encoding the mitochondrial aspartate/glutamate carrier isoform 1 (AGC1). Patients show arrested psychomotor development, seizures, cerebral atrophy and global hypomyelination, with a marked reduction in N-Acetyl-Aspartate (NAA), a crucial metabolite for myelin formation (Wibom et al, 2009; Falk et al, 2014). No cure is currently available. Ketogenic diet improves psychomotor symptoms and restore myelination (Dahlin et al, 2015), but mechanisms are still unclear. We have previously demonstrated an essential role of AGC1 in regulating the proliferation of neuron- (NPCs; Profilo et al, 2017) and oligodendrocyte-precursor cells (OPCs; Petralla et al, 2019), as well as in sustaining NAA synthesis, potentially explaining patients' clinical symptoms. In OPCs, AGC1 downregulation reduces proliferation through the dysregulation of trophic factors pathways, transcription factors, histone acetylation and HDACs expression, all involved in OPCs proliferation/differentiation (Palazuelos et al, 2015; Liu et al, 2016), without apparent changes in mitochondrial energetic activity (Petralla et al, 2019). A dysregulation in metabolites, such as acetyl-coA and  $\beta$ -oh-butyrate, whose level are regulated by AGC1 activity, are known to modulate HDACs activity, histone acetylation and therefore transcription (Menziez et al, 2016), suggesting a role of acetyl group precursors in limiting AGC1 deficiency pathogenesis. Therefore, the main aim of this proposal is to identify, in new and more appropriate in vitro models of the disease, the molecular, epigenetic and biochemical mechanisms that alter the myelination/remyelination process. We will focus on NPCs and OPCs involved in this process, by using: 1) control and siAGC1 neuronal and OPCs cell lines; 2) neurospheres, NPCs and OPCs from control and AGC1<sup>+/-</sup> mice sub-ventricular zone; 3) human iPSCs-derived NPCs and OPCs from healthy individuals and AGC1 deficiency patients. In these models, we will investigate, through molecular and computational biology, transcriptional and epigenetic targets potentially influencing myelination, as well as the altered cytosolic and mitochondrial pathways, through biochemistry and metabolomic approach. Finally, we will demonstrate the validity of identified targets through in vitro proof of concept experiments. This multidisciplinary approach will help to identify the altered mechanisms leading to dysregulation of myelination in AGC1 deficiency, thus indicating the potential targets to counteract AGC1 deficiency hypomyelination and eventually develop more appropriate and personalized therapies for patients. Furthermore, considering that AGC1 deficiency shares many clinical features with other rare neurological diseases, including hypomyelination, these targets could be also tested in other similar pathologies.



Alla ricerca di nuovi bersagli terapeutici per contrastare l'ipomielinizzazione nell'AGC1-deficiency: uno studio multidisciplinare sui precursori delle cellule cerebrali.

L'AGC1 deficiency (EIEE39, OMIM 612949) è una malattia genetica rara che determina una grave encefalopatia nella prima infanzia: è causata da mutazioni nel gene SLC25A12 che codifica per l'isoforma 1 del trasportatore mitocondriale di aspartato/glutammato (AGC1). I pazienti presentano ritardo psicomotorio, epilessia, atrofia cerebrale e diffusa ipomielinizzazione nel cervello, con marcata riduzione dell'N-acetil-aspartato (NAA), un metabolita cruciale per la formazione della mielina. Nessuna cura è attualmente disponibile. La dieta chetogenica migliora i sintomi psicomotori e permette un recupero della mielinizzazione (Dahlin et al, 2015), ma i meccanismi con cui agisce non sono ancora chiari. La mielinizzazione è un processo che coinvolge sia i neuroni che gli oligodendrociti, che li avvolgono e che si differenziano a partire da precursori in proliferazione. In precedenza, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato un ruolo essenziale di AGC1 nella regolazione della proliferazione sia dei precursori dei neuroni (NPC; Profilo et al, 2017) che degli oligodendrociti (OPC; Petralla et al, 2019), nonché nella sintesi di NAA, contribuendo a spiegare i sintomi clinici dei pazienti. Nelle OPC, il deficit di AGC1 riduce la proliferazione attraverso la disregolazione di fattori trofici dovuta all'alterazione di fattori di trascrizione e dell'acetilazione degli istoni, meccanismi coinvolti nella proliferazione/differenziamento delle OPC stesse (Palazuelos et al, 2015; Liu et al, 2016), senza apparenti alterazioni dell'attività energetica mitocondriale (Petralla et al, 2019). Poiché è noto che metaboliti regolati dall'AGC1 modulano l'acetilazione degli istoni e quindi la trascrizione di geni (Menzies et al, 2016), ciò suggerisce un legame tra metabolismo mitocondriale e acetilazione degli istoni nella disregolazione della proliferazione dei precursori di cellule cerebrali nell'AGC1-deficiency. Pertanto, l'obiettivo principale del progetto è identificare i meccanismi molecolari, epigenetici e biochimici che alterano il processo di mielinizzazione/rimielinizzazione. Ci concentreremo sia sui precursori neuronali che degli oligodendrociti, utilizzando diversi modelli in vitro e un approccio multidisciplinare che spazia dalla biologia molecolare e computazionale alla biochimica e metabolica: ciò aiuterà a identificare i meccanismi alterati che portano alla disregolazione della mielinizzazione nell'AGC1 deficiency, indicando così potenziali target per contrastare l'ipomielinizzazione e sviluppare terapie più appropriate e personalizzate per i pazienti. Inoltre, poiché l'AGC1 deficiency ha caratteristiche cliniche simili ad altre rare malattie neurologiche, tra cui la carenza di mielina, questi target potrebbero essere testati anche in altre patologie.

Dahlin M, Martin DA, Hedlund Z, Jonsson M, von Döbeln U, Wedell A. (2015) The ketogenic diet compensates for AGC1 deficiency and improves myelination. *Epilepsia*. 56(11):e176-81. doi: 10.1111/epi.13193.

Falk MJ, Li D, Gai X, McCormick E, Place E, Lasorsa FM, Otieno FG, Hou C, Kim CE, Abdel-Magid N, Vazquez L, Mentch FD, Chiavacci R, Liang J, Liu X, Jiang H, Giannuzzi G, Marsh ED, Yiran G, Tian L, Palmieri F, Hakonarson H. (2014) AGC1 Deficiency Causes Infantile Epilepsy, Abnormal Myelination, and Reduced NAcetylaspartate. *JIMD Rep*. 14:77-85. doi: 10.1007/8904\_2013\_287.

Liu J, Moyon S, Hernandez M, Casaccia P. (2016) Epigenetic control of oligodendrocyte development: adding new players to old keepers. *Curr Opin Neurobiol*. 39:133-8. doi: 10.1016/j.conb.2016.06.002.

Menzies KJ, Zhang H, Katsyuba E, Auwerx J. (2016) Protein acetylation in metabolism - metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol*. 12(1):43-60. doi: 10.1038/nrendo.2015.181.

Palazuelos J, Klingener M, Aguirre A. (2014) TGF $\beta$  signaling regulates the timing of CNS myelination

by modulating oligodendrocyte progenitor cell cycle exit through SMAD3/4/FoxO1/Sp1. *J Neurosci.* 34(23):7917-30. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0363-14.2014.

Petralla S.\*, Peña-Altamira LE\*, Poeta E, Massenzio F, Virgili M, Barile SN, Sbano L, Profilo E, Corricelli M, Danese A, Giorgi C, Ostan R, Capri M, Pinton P, Palmieri F, Lasorsa FM#, Monti B#. (2019) Deficiency of mitochondrial Aspartate/glutamate Carrier 1 leads to Oligodendrocyte Precursor cell proliferation defects both in vitro and in vivo. *IJMS* September 2019. doi: 10.3390/ijms20184486.

Profilo, E., Peña-Altamira, L. E., Corricelli, M., Castegna, A., Danese, A., Agrimi, G., Petralla, S., Giannuzzi, G., Porcelli, V., Sbano, L., Viscomi, C., Massenzio, F., Palmieri, E. M., Giorgi, C., Fiermonte, G., Virgili, M., Palmieri, L., Zeviani, M., Pinton, P., Monti, B., Palmieri, F., & Lasorsa, F. M. (2017). Down-regulation of the mitochondrial aspartate-glutamate carrier isoform 1 AGC1 inhibits proliferation and N-acetylaspartate synthesis in Neuro2A cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1863(6), 1422-1435. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.02.022.

Wibom R, Lasorsa FM, Töhönen V, Barbaro M, Sterky FH, Kucinski T, Naess K, Jonsson M, Pierri CL, Palmieri F, Wedell A. (2009) AGC1 deficiency associated with global cerebral hypomyelination. *N Engl J Med.* 361(5):489-95. doi: 10.1056/NEJMoa0900591

Deficit di AGC1

Coordinator: Barbara Monti  
Partner: Francesco Massimo Lasorsa  
Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19067

**Disease Name:**

AGC1 Deficiency

**Keywords:**

Hypomyelination, Global Cerebral Psychomotor Disorders, Mitochondrial Diseases

## Poster P.06.34

### THE AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME – FROM NUCLEIC ACID SENSING TO DISEASE MODELLING

Giordano A.M.S.<sup>[1]</sup>, Luciani M.<sup>[1]</sup>, Migliara A.<sup>[1]</sup>, Cairati N.<sup>[2]</sup>, Giliani S.<sup>[3]</sup>, Fazzi E.<sup>[3]</sup>, Cereda C.<sup>[4]</sup>, Orcesi S.<sup>[4]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Lombardo A.<sup>[1]</sup>, Gritti A.<sup>[1]</sup>, Kajaste--Rudnitski A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>SR-TIGET ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>The International Aicardi-Goutières Syndrome Association (I.A.G.S.A) ~ Lacchiarella ~ Italy,

<sup>[3]</sup>University of Brescia ~ Brescia ~ Italy, <sup>[4]</sup>C. Mondino National Neurological Institute ~ Pavia ~ Italy

Deregulation of cell intrinsic pathways of nucleic acid sensing is emerging as a potential driver of several autoinflammatory and autoimmune diseases. Among these, aberrant sensing of nucleic acids originating from the expression of endogenous retroviral elements (ERE) or accumulating DNA damage and consequent increase in type I IFN levels have been suggested to be a primary driver of pathogenesis of the Aicardi-Goutières Syndrome (AGS). AGS is a rare monogenic inflammatory encephalopathy that can be caused by mutations in any one of seven genes encoding for proteins involved in the metabolism/processing of RNA/DNA. Nevertheless, the precise molecular mechanisms triggering disease remain elusive due to the lack of viable animal models recapitulating the human neuropathology and thus far few molecular studies conducted in physiologically relevant cell types.

On these premises, we are investigating the cell intrinsic consequences of AGS mutations using induced pluripotent stem cells (iPSC), in which we have mimicked loss of AGS genes. These iPSC can then be in vitro differentiated into neural progenitors such as astrocytes and neurons. Thus far we have observed that AGS gene defects lead to aberrant activation of antiviral, inflammatory and DNA damage responses in AGS astrocytes with toxic consequences on unmodified wild-type neurons exposed to AGS astrocyte-conditioned media. Together, these results provide a first temporal indication on the emergence of endogenous triggers leading to AGS phenotypes along the neuronal differentiation in vitro and an experimental framework to dissect the distinct cellular and molecular events underlying AGS neuropathology. On-going efforts aim to confirm these alterations in patient iPSC-derived neural progenitors with the ultimate goal of identifying druggable molecular triggers of AGS.

### IL SINDROME DI AICARDI-GOUTIÈRES – DAL RICONOSCIMENTO DEGLI ACIDI NUCLEICI AD UN MODELLO DI MALATTIA

Tra i fattori eziologici dei processi autoinfiammatori e delle patologie autoimmuni sta recentemente emergendo la deregolazione del sistema cellulare di riconoscimento degli acidi nucleici. In particolare, la maggiore espressione trascrizionale degli elementi retrovirali endogeni (ERE) o l'accumulo di danno al DNA con la conseguente crescita dei livelli di Inteferone di Tipo I sono stati proposti come cause originarie della patogenesi della sindrome di Aicardi-Goutières (SAG). SAG è un'encefalopatia infiammatoria che può essere causata da mutazioni su sette geni codificanti per proteine coinvolte nel riconoscimento e nel metabolismo degli acidi nucleici. Ad oggi il meccanismo molecolare alla base della patologia rimane ancora incerto a causa della mancanza di modelli animali e cellulari che siano in grado di ricapitolare in vivo e in vitro l'aspetto neurologico di questa sindrome.

Su queste premesse, stiamo studiando l'effetto molecolare delle mutazioni in alcuni dei geni causativi della SAG tramite approcci sperimentali che mimano i difetti genetici nel contesto di cellule staminali pluripotenti (iPSC). Questi iPSC possono successivamente essere differenziati in varie popolazioni

cellulari del sistema nervoso centrale, come astrociti e neuroni. Finora, i nostri studi hanno rivelato l'insorgenza di una attivazione anormale di risposte antivirali, pro-infiammatorie e di danno al DNA in astrociti difettosi per geni SAG, con effetti tossici su cellule neuronali sani. Le alterazioni così identificate e le loro conseguenze funzionali saranno validate in progenitori neurali derivati da iPSC da pazienti SAG. Nel complesso, questo progetto esplorativo vuole investigare, in tipi cellulari fisiologicamente rilevanti, le cause molecolari alla base della sindrome di Aicardi-Goutières. L'identificazione di nuovi potenziali target e di parametri funzionali che possano essere monitorati nei pazienti getterà le basi per lo sviluppo di strategie terapeutiche.

-

Sindrome di Aicardi-Goutières

Coordinator: Anna Kajaste-Rudnitski

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16D03

**Disease Name:**

Aicardi-Goutières Syndrome

**Keywords:**

Aicardi-Goutières Syndrome, iPSC-derived neural progenitors, Innate immunity and inflammation

## Poster P.06.35

### IMPROVING DEVELOPMENTAL TRAJECTORIES IN 22Q11.2 DELETION SYNDROME BY OXYTOCIN: FOCUS ON ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS.

Ciampoli M.<sup>[1]</sup>, Castellani G.<sup>[1]</sup>, Ferretti V.<sup>[1]</sup>, Chini B.<sup>[2]</sup>, Papaleo F.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>CNR ~ Milano ~ Italy

#### Objectives and aims

The objective of this project is to implement, in a biologically-supported way, an intranasal oxytocin (OXT) treatment to ameliorate the still incurable social, cognitive and immune system deficits characterizing the 22q11.2 microdeletion syndrome (22q11.2DS). Specifically, we will identify the selective behavioral domains, as well as the central and peripheral immune system components ameliorated by perinatal or adolescent exposure to OXT in the LgDel/+ 22q11.2DS mouse model. Then, we will disentangle the specific brain-immune connections involved in the rescue process.

#### Background/Rationale

Our preliminary evidence indicates that in 22q11.2DS mice, which embed the well conserved full hemideletion found in 22q11.2DS patients, perinatal OXT exposure ameliorates some social and immune developmental trajectories. However, the extend of the ameliorative effects in other social, cognitive and immune system deficits, as well as the role played by the brain-immune interconnections in the mechanisms of rescue is unknown.

#### Research design and methods

Using LgDel/+ mice, we will first comprehensively characterize the behavioral and immune system consequences of intranasal OXT given at different developmental periods. We will use state-of-the-art behavioral assays, with proved validity to the clinics, as well as a series of in-depth assessments of the functionality of both the peripheral and central immune system (e.g. Tcells, monocyte-derived macrophages infiltration, microglia activation). Next, to sort OXT-dependent mechanisms, we will manipulate selective immune system components at the peripheral or central levels, checking for peripheral-brain immune communication via the choroid plexus.

#### Anticipated output

Establish a new strategy to correct altered developmental trajectories in 22q11.2DS, at the same time providing new knowledge on OXT neuroimmunomodulatory effects and immune-brain communication as the base of psychiatric-relevant phenotypes and treatments.

Ossitocina nella sindrome da delezione 22q11.2: implicazione di possibili effetti anti-infiammatori.

#### Obiettivi e scopo

L'obiettivo di questo progetto è di investigare i possibili effetti di un trattamento con ossitocina (OXT) per migliorare i deficit sociali, cognitivi e del sistema immunitario che caratterizzano la sindrome da microdelezione 22q11.2 (22q11.2DS). In particolare, identificheremo l'impatto dell'esposizione perinatale o adolescenziale con OXT nel modello di murino di 22q11.2DS LgDel/+ sia da un punto di vista comportamentale che delle connessioni tra cervello e sistema immunitario.

#### Razionale

Nostri esperimenti preliminari indicano che nei topi 22q11.2DS LgDel/+ l'esposizione perinatale con OXT potrebbe migliorare lo sviluppo di alcune funzioni sociali e del sistema immunitario. Tuttavia, non è noto quanto questi effetti siano evidenti in altri deficit sociali, cognitivi e del sistema immunitario,

nonché l'implicazione delle connessioni tra cervello e sistema immunitario.

Piano della ricerca

Utilizzando il modello murino LgDel/+, per prima cosa caratterizzeremo le conseguenze comportamentali e del sistema immunitario del trattamento intranasale con OXT effettuato in diversi periodi dello sviluppo. Useremo test comportamentali con comprovata translabilità nell'uomo, nonché una serie di valutazioni approfondite della funzionalità del sistema immunitario periferico e centrale. Successivamente, per identificare i meccanismi immunomodulatori dell'OXT, manipoleremo in maniera selettiva componenti del sistema immunitario a livello periferico o centrale, e la loro comunicazione tramite il plesso coroidale.

Risultati attesi

Stabilire una nuova strategia per migliorare le traiettorie di sviluppo nella 22q11.2DS, fornendo allo stesso tempo nuove conoscenze sugli effetti neuroimmunomodulatori dell'OXT.

N/A

Sindrome da delezione 22q11.2

Coordinator: Francesco Papaleo

Partner: Bice Chini

Duration (N. Years): 3

Starting: February 2020

**Telethon Project (nr):**

GGP19103

**Disease Name:**

Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome

**Keywords:**

oxytocin, 22q11.2 deletion syndrome, neuroimmunomodulation

## Poster P.06.36

### ENHANCED THALAMOCORTICAL SYNAPTIC TRANSMISSION AND DYSREGULATION OF THE EXCITATORY-INHIBITORY BALANCE AT THE THALAMOCORTICAL FEED-FORWARD INHIBITORY MICROCIRCUIT IN A MOUSE MODEL OF FAMILIAL HEMIPLEGIC MIGRAINE

Tottene A.<sup>[1]</sup>, Favero M.<sup>[2]</sup>, Pietrobon D.<sup>\*[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dept of Biomedical Sciences ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dept of Neuroscience ~ Verona ~ Italy

Familial hemiplegic migraine (FHM) is a rare monogenic form of migraine with aura, characterized by attacks of severe unilateral headache and aura symptoms (including visual, somatosensory, language disturbances and hemiparesis) which may be long-lasting, as well as by interictal alterations in sensory physiology. The neurobiological mechanisms underlying the onset of migraine attacks and the interictal dysfunction in multisensory information processing in FHM and other migraines remain unknown (Brennan-Pietrobon 2018). FHM type 1 (FHM1) is caused by gain-of-function mutations in the CaV2.1 channel, which plays a dominant role in neurotransmitter release at many brain synapses (Pietrobon, 2013). We have previously shown that excitatory synaptic transmission at several intracortical pyramidal cell synapses is enhanced in knock-in mice carrying FHM1 mutations (FHM1 mice); in striking contrast, inhibitory synaptic transmission at fast-spiking (FS) and other interneuron synapses is unaltered (Tottene et al, 2009; Vecchia et al, 2015). These findings suggested the hypothesis that dysregulation of the excitatory-inhibitory (E/I) balance in specific circuits in the cerebral cortex (and other brain structures) is a key pathogenic mechanism in FHM (Vecchia-Pietrobon, 2012). Here, to test this hypothesis, we investigated thalamocortical (TC) synaptic transmission and the E/I balance set by the TC feed-forward inhibitory (FFI) microcircuit in FHM1 mice. This microcircuit is very interesting to study in the context of migraine because it is critical in gating information flow to the cortex (including trigeminovascular nociceptive information) and in coordinating excitation and inhibition in the initial phases of cortical sensory processing preventing over-excitation (Tremblay et al, 2016). We show that TC synaptic transmission in somatosensory cortex is enhanced in FHM1 mice. Due to similar gain-of-function of TC excitation of layer 4 excitatory and fast-spiking (FS) inhibitory neurons elicited by single thalamic stimulations, neither the E/I balance nor the integration time window set by the TC FFI microcircuit were altered in FHM1 mice. However, during repetitive thalamic stimulation, the typical shift of the E/I balance towards excitation and the widening of the integration time window were both smaller in FHM1 compared to wild-type mice, revealing a dysregulation of the E/I balance, whereby the balance is relatively skewed towards inhibition. This is due to an unexpected differential effect of the FHM1 mutation on short-term synaptic plasticity at TC synapses on cortical excitatory and FS inhibitory neurons. Our findings point to enhanced transmission of sensory, including trigeminovascular nociceptive, signals from thalamic nuclei to cortex and TC E/I imbalance as mechanisms that may contribute to the headache and to increased sensory gain and sensory processing dysfunctions in FHM.

Aumentata trasmissione sinaptica talamo-corticale e disregolazione del bilancio eccitazione-inibizione nel microcircuito talamo-corticale in un modello animale di emicrania emiplegica familiare.

L'obiettivo generale del nostro progetto di ricerca e' quello di capire i meccanismi che causano l'emicrania emiplegica familiare (FHM), una forma rara di emicrania con aura, caratterizzata da attacchi gravi di mal di testa unilaterale e sintomi dell'aura (includenti disturbi visivi, sensitivi, di linguaggio e emiparesi) che possono essere molto prolungati. I meccanismi neurobiologici che

causano gli attacchi di emicrania e le disfunzioni interictali nel processamento degli stimoli sensoriali nella FHM e altre emicranie rimangono sconosciuti. Noi studiamo tali meccanismi utilizzando topi transgenici “knock-in” portanti mutazioni umane come modello animale (topi FHM). La FHM di tipo 1 (FHM1) è causata da mutazioni determinanti guadagno di funzione in un canale del calcio che è essenziale per il controllo del rilascio di neurotrasmettitore alle sinapsi cerebrali. Abbiamo precedentemente dimostrato che nei topi FHM1 la trasmissione sinaptica alle sinapsi eccitatorie intracorticali è aumentata, mentre la trasmissione alle sinapsi inibitorie è inalterata. Questi risultati hanno suggerito l’ipotesi che l’alterata regolazione del bilancio eccitazione-inibizione in specifici circuiti della corteccia cerebrale (e altre aree del cervello) sia un meccanismo chiave nella patogenesi della FHM. Per verificare questa ipotesi abbiamo studiato nei topi FHM1 la trasmissione sinaptica talamo-corticale e il bilancio eccitazione-inibizione del microcircuito talamo-corticale, che media inibizione “feedforward” e svolge un ruolo critico nel trasferimento dell’informazione sensoriale (inclusa quella nocicettiva trigemino-vascolare) alla corteccia cerebrale e nel prevenire la sovra-eccitazione. I nostri dati mostrano una aumentata trasmissione sinaptica talamo-corticale e una disregolazione del bilancio eccitazione-inibizione del microcircuito talamo-corticale nei topi FHM1. Queste alterazioni possono contribuire a generare il mal di testa e le disfunzioni nel processamento degli stimoli sensoriali nella FHM.

Brennan KC, Pietrobon D (2018) A Systems Neuroscience Approach to Migraine. *Neuron* 97:1004-1021.

Pietrobon D (2013) Calcium channels and migraine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828:1655-1665.

Tottene A, Conti R, Fabbro A, Vecchia D, Shapovalova M, Santello M, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Pietrobon D (2009) Enhanced Excitatory Transmission at Cortical Synapses as the Basis for Facilitated Spreading Depression in Ca(v)2.1 Knockin Migraine Mice. *Neuron* 61:762-773.

Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91:260-292.

Vecchia D, Pietrobon D (2012) Migraine: a disorder of brain excitatory–inhibitory balance? *Trends in Neurosciences* 35:507-520.

Vecchia D, Tottene A, van den Maagdenberg AMJM, Pietrobon D (2015) Abnormal cortical synaptic transmission in CaV2.1 knockin mice with the S218L missense mutation which causes a severe familial hemiplegic migraine syndrome in humans. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:8.

Emicrania Emiplegica Familiare

Coordinator: Daniela Pietrobon

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP14234

**Disease Name:**

Familial Hemiplegic Migraine

**Keywords:**



familial hemiplegic migraine, excitatory inhibitory balance, synaptic transmission

## Poster P.06.37

### A NOVEL COMPREHENSIVE STRATEGY FOR THE STUDY OF THE MOLECULAR BASIS OF FAMILIAL HEMIPLEGIC MIGRAINE 3

Barbieri R.<sup>[1]</sup>, Bertelli S.<sup>[2]</sup>, Pusch M.<sup>[1]</sup>, Gavazzo P.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>*Biophysics Institute-CNR ~ Genova ~ Italy*, <sup>[2]</sup>*SISSA ~ Trieste ~ Italy*

Familial hemiplegic migraine 3 (FHM3) is a severe form of migraine associated with aura and transient hemiparesis, caused by mutations in the Nav1.1 channel encoding SCN1A gene, known as a major epilepsy gene as well. So far conflicting results have been obtained from the investigation of functional consequences of FHM3-related mutations in heterologous expression systems. The purpose of our project is to investigate the mechanisms underlying migraine in FHM3 with the idea to get a univocal picture of FHM3 pathomechanisms. The research takes advantage of two complementary models: HEK cells transfected with a SCN1A plasmid carrying FHM3-related mutations and a FHM3 knock-in mouse model (Scn1AL1649Q). A novel optimized SCN1A containing-plasmid was designed in silico and synthesized, and migraine mutations were inserted in this background. Whole-cell patch clamp was performed to investigate the functional properties of mutant Nav1.1 transiently expressed in HEK cells in terms of activation, inactivation, and persistent Na<sup>+</sup> current. The investigation was extended to all 12 so far known FHM3-related mutations in search of a unifying phenotype; most mutants exhibited the same current density as WT and showed a shift of the steady state inactivation to more positive voltages, accelerated recovery from inactivation, and an increase of the persistent current, confirming that most FHM3 mutations induced a gain of function effect. The application of GS967, a late Na<sup>+</sup> current blocker, inhibited persistent currents of all FHM3 mutated channels, thereby stabilizing their inactivated state. To get as close as possible to the situation found in patients we took advantage of a knock-in mouse model carrying the L1649Q FHM3 mutation and focussed on the investigation of electrophysiological properties of acutely dissociated cerebellar Purkinje cells from WT, heterozygous and homozygous knock-in phenotype between P16-P27. The results confirmed that the L1649Q-SCN1A mutation directly interferes with the inactivation process of the channel in dissociated Purkinje neurons slowing down of the inactivation of the current and an increasing the persistent current. The physiological effect of the mutation would consist in a "gain of function" of the Na currents in GABAergic inhibitory neurons; result that fits well with the onset of "cortical spreading depression" associated with the painful event of migraine.

We expect to extend our ex vivo investigation to a new mouse model now available in our laboratory carrying the mutation F383S in SCN1A that renders Nav1.1 channel insensitive to tetrodotoxin (TTX). This will permit to distinguish the contribute of Nav1.1 current from that of the other TTX- sensitive Na channels (Nav1.2, 1.3, 1.6) usually expressed in neurons.

In conclusion our results confirm that FHM3 defects produce a gain of function effect of Nav1.1 channel and indicate the blocker GS967 as a promising specific pharmacological treatment of FHM3.

Una nuova strategia integrata per lo studio delle basi molecolari dell'Emicrania Emiplegica Familiare 3 (GGP17178)

L'emicrania emiplegica familiare 3 (FHM3), forma di emicrania grave associata ad emiparesi transitoria ed aura, è causata da mutazioni nel gene SCN1A che codifica per il canale ionico del Na(+)

Nav1.1, responsabile della generazione e trasmissione dei segnali elettrici veloci utilizzati dalle cellule nervose per comunicare su lunghe distanze. Il nostro progetto è focalizzato sullo studio dei meccanismi molecolari che determinano l'insorgenza della FHM3, con l'idea di ottenere un quadro finalmente univoco dei meccanismi patologici responsabili della malattia, visto che i risultati finora disponibili in letteratura sui cambiamenti funzionali di Nav1.1 mutati nella FHM3 sono talvolta in contrasto tra di loro.

La nostra ricerca si avvale di due strategie elettrofisiologiche parallele: studio delle cellule in coltura (HEK293) che esprimono in modo transitorio canali Nav1.1 mutati e studio di un modello di topo geneticamente modificato con l'introduzione della mutazione L1649Q responsabile di FHM3. Abbiamo progettato e sintetizzato una sequenza "ottimizzata" del gene SCN1A che ha facilitato lo studio delle correnti ioniche prodotte dalle 12 mutazioni FHM3 finora note; è risultato che la maggior parte dei mutanti FHM3 induce un "guadagno di funzione" del canale Nav1.1. L'applicazione di GS967, un bloccante della corrente cosiddetta "tardiva" di Na(+), ha ridotto l'effetto dovuto ai mutanti, stabilizzando i canali mutati nel loro stato inattivato. Per avvicinarci il più possibile alla situazione riscontrata nei pazienti, abbiamo a disposizione un modello di topo che porta la mutazione L1649Q di FHM3; ci siamo concentrati sull'analisi delle proprietà elettrofisiologiche delle cellule Purkinje del cervelletto dissociate da topi WT, eterozigote o omozigote per la mutazione. I risultati hanno confermato che la mutazione L1649Q-SCN1A interferisce direttamente con l'attività dei canali Nav1.1 incrementandola. Anche in questo modello quindi l'effetto fisiologico della mutazione FHM3 consiste in un "guadagno di funzione"; risultato che si adatta bene all'insorgenza della "depressione corticale propagata" (cortical spreading depression, CSD) associata all'evento doloroso dell'emicrania.

Ci aspettiamo di estendere la nostra indagine ex vivo ad un nuovo modello di topo ora disponibile nel nostro laboratorio che trasporta la mutazione F383S in SCN1A e che rende il canale Nav1.1 insensibile alla tetrodotossina (TTX). Ciò consentirà di distinguere il contributo della corrente Nav1.1 da quello degli altri canali Na(+) sensibili al TTX (Nav1.2, 1.3, 1.6) normalmente espressi nei neuroni. In conclusione, i nostri risultati confermano che i difetti dell' FHM3 producono un guadagno dell'effetto funzionale del canale Nav1.1 e quindi una sua iperattività ed indicano il bloccante GS967 come promettente trattamento farmacologico specifico dell'FHM3.

Anderson LL, Hawkins NA, Thompson CH, Kearney JA, George AL, Jr. Unexpected Efficacy of a Novel Sodium Channel Modulator in Dravet Syndrome. *Sci Rep.* 2017;7(1):1682. Epub 2017/05/12.

Bertelli S, Barbieri R, Pusch M, Gavazzo P. Gain of function of sporadic/familial hemiplegic migraine-causing SCN1A mutations: Use of an optimized cDNA. *Cephalalgia.* 2019;39(4):477-88. Epub 2018/07/11.

Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, et al. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet.* 2005;366(9483):371-7.

Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:365-91. Epub 2012/11/30.

Emicrania Emiplegica Familiare di tipo 3

Coordinator: Paola Gavazzo  
Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17178

**Disease Name:**

Familial Hemiplegic Migraine 3

**Keywords:**

Nav1.1, Patch clamp, GS967

## Poster P.06.38

### ROLE OF ER-PHAGY IN HEREDITARY SENSORY AXONOPATHIES

Grumati P.\*

*TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy*

Axonopathies are characterized by a length dependent degeneration of long neuronal projections and can either manifest as a predominant sensory, autonomic, or motor polyneuropathy or as hereditary spastic paraplegia. Our understanding of these disorders is mainly limited to a basic phenotypic description, while the molecular details remain obscure. So far, there are no pharmacological treatments able to rescue or arrest the progression of the pathology. Therefore, elucidating the molecular mechanisms responsible for the neuronal degeneration would help to identify new pharmacological targets.

Genes linked to axonopathies often turned out to encode for components of the endoplasmic reticulum (ER) like: ATLASTINS, reticulon family (RTNs) and FAM134B. We have recently described that FAM134B facilitates the degradation of defined portions of the ER via selective autophagy (ER-phagy). Mutant FAM134B proteins, that cause sensory neuropathy in humans, are unable to act as ER-phagy receptors. Therefore, selective ER-phagy via FAM134B is indispensable for mammalian cell homeostasis. Thus, we hypothesize that the continuous membranous network of the ER plays a central role for long term axon survival. Moreover, Fam134b<sup>-/-</sup> mice show a neurological phenotype resembling the clinical symptoms of human patients carrying FAM134B mutations. Using the new technologies in genome editing, imaging and proteomics, we propose to unravel the molecular mechanisms in ER-related axonal disorders in a combined effort. To reveal how FAM134B remodels the ER, we will identify its ER-anchored interactomes and analyze its post-translational modifications that can regulate its function. Comparison of full proteome from wild-type and FAM134B null cells will highlight the molecular pathways affected by FAM134B absence. Of note, FAM134B belongs to a protein family with two more members: FAM134A and FAM134C, which are barely characterized. We will analyze interactomes of FAM134A and FAM134C under the same conditions as for FAM134B. Moreover, we will perform a full proteome analysis using Fam134a,b,c knockout MEFs. Identified peptides and interacting partners will reveal overlapping and specific functions of these rather unstudied family members paving the way to the characterization of their possible involvement in human diseases.

Ruolo dell'autofagia selettiva del reticolo endoplasmatico nelle assonopatie sensoriali ereditarie

Le assonopatie sono caratterizzate da una degenerazione progressiva delle terminazioni neuronali e possono manifestarsi come: neuropatia sensoriale, neuropatia motoria o paraplegia spastica ereditaria. La nostra comprensione di questi disturbi è principalmente limitata a una descrizione fenotipica di base, mentre i dettagli molecolari rimangono oscuri. Finora non esistono trattamenti farmacologici in grado di salvare o arrestare la progressione della patologia. Pertanto, chiarire i meccanismi molecolari responsabili della degenerazione neuronale aiuterebbe a identificare nuovi obiettivi farmacologici.

I geni collegati alle assonopatie codificano per componenti del reticolo endoplasmatico (ER) come: Atlantine, Reticuloni (RTN) e FAM134B. Abbiamo recentemente descritto come FAM134B facilita il

degrado di porzioni definite di ER attraverso l'autofagia selettiva (ER-phagy). Le mutazioni di FAM134B, responsabili della neuropatia sensoriale nell'uomo, precludono la sua funzione come recettore specifico per l'ER-phagy. Pertanto, il turn-over della rete membranosa dell'ER ha un ruolo centrale per la sopravvivenza degli assoni neuro-sensoriali. Inoltre, i topi privi di Fam134b manifestano un fenotipo neurologico simile ai sintomi clinici dei pazienti umani. Usando le nuove tecnologie del gene editing, dell'imaging cellulare e della proteomica, proponiamo di svelare le alterazioni nei meccanismi molecolari responsabili dei disturbi neuronali legati all'ER. Per rivelare come FAM134B rimodella l'ER, identificheremo i suoi partner molecolari e analizzeremo le sue modifiche post-traduzionali che possono regolarne la funzione. Il confronto del proteoma completo da cellule prive di FAM134B evidenzierà i network molecolari interessati dall'assenza della proteina. Inoltre è importante ricordare che FAM134B appartiene ad una famiglia di proteine che comprende altri due membri poco caratterizzati: FAM134A e FAM134C. Analizzeremo gli interattomi di FAM134A e FAM134C nelle stesse condizioni di FAM134B. Inoltre, eseguiremo un'analisi completa del proteoma utilizzando cellule prive di FAM134A,B e C. I risultati di questi esperimenti riveleranno sovrapposizioni e funzioni specifiche dei tre membri della famiglia delle FAM134, aprendo la strada alla caratterizzazione del loro possibile coinvolgimento nelle malattie umane.

- Khaminets, A. et al. Nature 522: 354-8 (2015).
- Kurth, I. et al. Nat Genet 41: 1179-81 (2009).
- Hubner, C. A. & Kurth, I. Brain 137: 3109-21 (2014).

Assonopatie sensoriali ereditarie

Coordinator: Paolo Grumati

Duration (N. Years): 1

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Hereditary Sensory Axonopathies

**Keywords:**

Axonopathies, Endoplasmic Reticulum, Autophagy

## Poster P.06.39

### TRPML1 LINKS LYSOSOMAL CALCIUM TO AUTOPHAGY INITIATION

Scotto Rosato A., Medina D.L.\*

*TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy*

TRPML1 (or Mucolipin 1) is a cation-permeable channel localized on the membranes of late endosomes and lysosomes (LELs) of mammalian cells. TRPML1 has been involved in vesicular trafficking, vesicular fusion, phagocytosis of large particles, and lysosomal exocytosis (Medina et al, 2011; Xu et al, 2015; Venkatachalam et al, 2015; Li et al, 2016). We have recently shown that lysosomal Ca<sup>2+</sup> release, through TRPML1, plays a major role in lysosomal adaptation to starvation by inducing calcineurin that de-phosphorylates and activates TFEB, a master gene of lysosomal function (Medina et al, 2015). While studying the role of TRPML1 in autophagy, we also observed that the inhibition of TRPML1 significantly reduced the recruitment of the WD-repeat PtdIns(3)P effector protein WIPI2 to vesicles (Medina et al, 2015). Since WIPI2 is an essential effector at the nascent autophagosome (Proikas-Cezanne et al, 2015), we reasoned that the activity of the lysosomal calcium channel TRPML1 may play a role in autophagosome biogenesis. Indeed, we found that genetically and pharmacologically inhibition of TRPML1 during starvation, significantly reduced the number of vesicles containing both WIPI2 and the phagophore marker DFCP1. Conversely, TRPML1 overexpression increased phagophore formation inducing autophagic flux. Interestingly, WIPI2-puncta formation during starvation was also reduced in fibroblasts derived from human patients affected of Mucopolysaccharidosis type IV, a lysosomal storage disease caused by loss-of-function mutations in TRPML1 gene. We also found that TRPML1-mediated effects require both calcium and PtdIns(3)P, since the addition of BAPTA chelator or the inhibition of PIK3C3 during starvation completely abolish WIPI2 puncta formation. Together, our results suggest that TRPML1 and lysosomal Ca<sup>2+</sup> modulate autophagy by the recruitment of PtdIns(3)P to the phagophore membrane during autophagy initiation.

TRPML1 collega il calcio lisosomiale all'inizio dell'autofagia

TRPML1 (o Mucolipin 1) è un canale permeabile al calcio localizzato sulle membrane di endosomi e lisosomi di cellule di mammiferi. TRPML1 è stato coinvolto nel traffico vescicolare, fusione vescicolare, fagocitosi di particelle di grandi dimensioni ed esocitosi lisosomiale (Medina et al, 2011; Xu et al, 2015; Venkatachalam et al, 2015; Li et al, 2016). Abbiamo recentemente dimostrato che il rilascio lisosomiale di calcio, attraverso TRPML1, svolge un ruolo importante nell'adattamento lisosomiale ai nutrienti (Medina et al, 2015). Durante lo studio del ruolo di TRPML1 nell'autofagia, abbiamo anche osservato che l'inibizione di TRPML1 ha ridotto significativamente il reclutamento della proteina WIPI2 (Medina et al, 2015). Poiché WIPI2 è un effettore essenziale dell'autofagosoma (Proikas-Cezanne et al, 2015), abbiamo pensato che l'attività del canale del calcio lisosomiale TRPML1 possa svolgere un ruolo nella biogenesi dell'autofagosoma. In effetti, abbiamo scoperto che l'inibizione di TRPML1 riduceva significativamente il numero di vescicole contenenti sia WIPI2 sia il marker di fagoforo DFCP1. Al contrario, la sovraespressione di TRPML1 aumenta la formazione di fagofori. È interessante notare che anche la formazione di fagofori durante l'induzione dell'autofagia era ridotta nei fibroblasti derivati da pazienti umani affetti da mucopolisaccaridosi di tipo IV, una malattia da accumulo lisosomiale causata da mutazioni nel gene TRPML1. Abbiamo anche scoperto che gli effetti mediati da TRPML1 richiedono sia calcio che PtdIns (3) P, poiché l'aggiunta del chelante di calcio BAPTA o

l'inibizione di PIK3C3 durante l'induzione della autofagia aboliscono completamente la formazione di fagofori. Insieme, i nostri risultati suggeriscono che TRPML1 e il calcio lisosomiale modulano l'autofagia mediante il reclutamento di PtdIns (3) P sulla membrana del fagoforo durante l'inizio dell'autofagia.

Medina et al, 2011;

Xu et al, 2015;

Venkatachalam et al, 2015;

Li et al, 2016

Medina et al, 2015

Proikas-Cezanne et al, 2015

Mucopolipidosi di tipo 4

Coordinator: Diego L. Medina

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

TIGEM; Granted by Mucopolipidosis type 4 foundation

**Disease Name:**

Mucopolipidosis Type 4 (MLIV)

**Keywords:**

autophagy, LSDs, TRPML1



## 07\_Genetic neurological disorder\Ataxias

## Poster P.07.40

### EXCITATORY/INHIBITORY UNBALANCE IN ATAXIA TELANGIECTASIA AND NEW THERAPEUTICAL INTERVENTIONS

**Focchi E.** <sup>[1]</sup>, Pizzamiglio L.<sup>[1]</sup>, Cambria C.<sup>[1]</sup>, Murru L.<sup>[2]</sup>, Passafaro M.<sup>[3]</sup>, Antonucci F.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto di neuroscienze del CNR ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>~ Italy

Ataxia Telangiectasia (A-T) is a rare genetic disorder caused by mutations in the ATM gene and characterized by ataxic movements, immune dysfunctions and genomic instability. Also cognitive disabilities are largely described in A-T patients. Even if ATM roles during cell division have been largely addressed, a large body of evidence clearly demonstrate new roles also in adult neurons, suggesting the lack of a complete understanding of its functions.

To directly address these new roles of ATM in neurons, supported by the evidence that cognitive defects occur also in presence of residual ATM activity, we took advantage of both ATM<sup>+/-</sup> and ATM<sup>-/-</sup> mouse models. Since its fundamental role in cognition we focused on the hippocampus, finding that the halving of ATM is sufficient to induce an excitatory-to-inhibitory unbalance, towards inhibition, as indicated by in vitro and in vivo electrophysiology. We also found that both ATM<sup>+/-</sup> and ATM<sup>-/-</sup> hippocampal neurons show an increased density of inhibitory synapses but, interestingly, only in ATM<sup>-/-</sup> neurons the evoked release and release probability at inhibitory synapse are potentiated. Also, both genotypes display a precocious development of the inhibitory system as indicated by the premature excitatory-to-inhibitory switch of GABA. This process is known to be triggered by the cotransporter KCC2, which we found more abundant in both genotypes. A clear link between KCC2 expression and increased ERK1/2 phosphorylation through the rapid activation of the transcription factor Egr4 was demonstrated. Indeed, by a Dual-luciferase reporter assay, we found a significantly potentiated Egr4 activation of KCC2b promoter in the ATM <sup>+/-</sup> model and increased ERK1/2 phosphorylation. Interestingly, in the ATM<sup>-/-</sup> we suggest a different mechanism based on the increased expression of the epigenetic regulator Mecp2, indicating that different transcriptional events occur, both responsible for a more inhibited system. Thus, the importance to find new therapeutic interventions for the treatment of cognitive defects in A-T. For this purpose, we tested the chronic administration of fluoxetine, since its effectiveness in downregulating hippocampal GABAergic transmission. We daily treated pregnant ATM<sup>+/-</sup> dams from gestational day 10 to delivery with 10 mg/kg fluoxetine. P40 offspring from fluoxetine-treated dams and controls (from saline-treated dams) were tested for spontaneous alternation behavioural test. We interestingly found that prenatal fluoxetine is able to prevent the cognitive impairments revealed by spontaneous alternation test at least in ATM<sup>+/-</sup> animals. We also collected indications that chronic fluoxetine could rescue cognitive disabilities by its administration in young-adult ATM<sup>-/-</sup> mice (P40-P50).

These data reveal novel roles of ATM in the mouse hippocampus and its involvement in unsuspected cellular pathways, laying the basis for a clearer comprehension of cognitive defects occurring in A-T and for new therapies.

Sbilanciamento tra eccitazione ed inibizione nell'A-T e nuovi approcci terapeutici

L'Atassia Telangectasia (A-T) è una malattia genetica rara, a trasmissione autosomica recessiva, causata da mutazioni a livello del gene ATM (A-T mutated). La malattia è caratterizzata da movimenti

atassici, causati da atrofia cerebellare, instabilità genomica e disordini immunitari. Anche difetti cognitivi sono stati ampiamente descritti nei pazienti A-T.

Al fine di indagare il coinvolgimento di ATM nei disturbi cognitivi osservati nei pazienti A-T, supportati dall'evidenza che questi si verificano anche in presenza di residua attività della proteina ATM, abbiamo sfruttato sia il modello murino ATM<sup>-/-</sup> che l'ATM<sup>+/-</sup>, focalizzandoci sull'area cerebrale principalmente deputata ai processi cognitivi: l'ippocampo.

Abbiamo dimostrato che la riduzione del 50% di ATM è sufficiente a determinare uno sbilanciamento tra eccitazione e inibizione, a favore dell'inibizione, in neuroni ippocampali, in vitro e in vivo. In linea, sia i neuroni ATM<sup>-/-</sup> che l'ATM<sup>+/-</sup>, mostrano un aumento delle sinapsi inibitorie (vGAT positivi), ma solo nei neuroni ATM<sup>-/-</sup> il rilascio evocato e la probabilità di rilascio delle sinapsi inibitorie sono potenziati. Entrambi i genotipi mostrano uno sviluppo precoce del sistema inibitorio dovuto ad un anticipato "switch del GABA", determinato da un'aumentata espressione del co-trasportatore KCC2. È stato dimostrato un legame tra KCC2 e l'aumento della fosforilazione di ERK1/2 attraverso la rapida attivazione del fattore di trascrizione Egr4. A riguardo, abbiamo rilevato un aumento dell'attività di Egr4 sul promotore di KCC2 nel modello ATM<sup>+/-</sup> e un aumento della fosforilazione di ERK 1/2. Nel modello ATM<sup>-/-</sup> invece, abbiamo individuato un meccanismo di regolazione diverso che si basa sull'aumento dell'espressione del fattore di regolazione epigenetico Mecp2. Data l'importanza di identificare nuovi approcci farmacologici per il trattamento dei difetti cognitivi associati all'A-T, abbiamo testato l'efficacia del farmaco fluoxetina. È stato infatti dimostrato che la somministrazione cronica di fluoxetina è in grado di normalizzare la trasmissione GABAergica ippocampale. Abbiamo trattato femmine gravide ATM<sup>+/-</sup> dal decimo giorno di gravidanza fino al parto, come descritto in letteratura. A 40 giorni di età la prole è stata sottoposta a test comportamentali che ci hanno permesso di dimostrare come il trattamento prenatale con fluoxetina sia in grado di prevenire i difetti cognitivi osservati in animali eterozigoti di controllo. Abbiamo inoltre osservato che la fluoxetina è in grado di migliorare i difetti cognitivi anche quando somministrata in cronico direttamente nell'animale giovane adulto ATM<sup>-/-</sup>.

Nel complesso il lavoro svolto ha permesso di chiarire i meccanismi molecolari responsabile dell'aumentato tono inibitorio a livello ippocampale in animali ATM<sup>-/-</sup> che l'ATM<sup>+/-</sup>, nonché di identificare un nuovo approccio farmacologico per i difetti cognitivi nell'A-T.

Allen DM, van Praag H, Ray J et al. Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis.

Genes Dev 2001;15:554 -566.

Bianchi P, Ciani E, Guidi S, Trazzi S, Felice D, Grossi G, Fernandez M, Giuliani A, Calzà L, Bartesaghi

R. Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model

for Down syndrome. J Neurosci. 2010 Jun 30;30(26):8769-79.

Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. Trends

Atassia Telangectasia

Coordinator: Flavia Antonucci

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16015

**Disease Name:**

Ataxia Telangiectasia

**Keywords:**

hippocampus, excitatory/inhibitory balance, drug repositioning

## Poster P.07.41

### REGULATION OF ALTERNATIVE SPLICING OF VOLTAGE-GATED CA<sup>2+</sup> CHANNELS BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING AS POTENTIAL GENETIC THERAPY FOR EPISODIC ATAXIA TYPE 2

Jaudon F.<sup>[1]</sup>, Fruscione F.<sup>[2]</sup>, Thalhammer A.<sup>[1]</sup>, Baldassari S.<sup>[2]</sup>, Zara F.<sup>[2]</sup>, Cingolani L.\*<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università di Trieste ~ Trieste ~ Italy

**Aims and objectives:** We aim at up-regulating the splice isoforms of CaV2.2 that are most efficient in supporting synaptic transmission, thus compensating for CaV2.1 deficiency, which characterizes episodic ataxia type 2 (EA2).

To this end, we will use genome editing to regulate alternative splicing of CaV2.2 in mouse models of EA2 and in induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons carrying EA2 mutations.

**Background/Rationale:** In EA2, loss-of-function mutations in CaV2.1 induce a compensatory up-regulation of CaV2.2 and CaV2.3. Despite this, the up-regulated channels are unable to substitute fully for CaV2.1, likely because they are not as efficient as CaV2.1 in supporting synaptic transmission.

We have recently found that the efficiency of CaV2.1 and CaV2.2 in supporting synaptic transmission is regulated by a splicing event generating two alternative isoforms for each channel (EFa and EFb). In the brain, the relative abundance of the two isoforms differs for presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels: expression of EFa -the isoform more efficient in supporting synaptic transmission- is high for CaV2.1 but low for CaV2.2 and CaV2.3.

We reasoned that CaV2.2 (and possibly CaV2.3) would substitute more efficiently for CaV2.1 if the relative abundance of their EFa isoforms could be increased.

**Research design:** We will (i) use CRISPR/Cas9-mediated genome editing to shift the balance between EFa and EFb isoforms in favor of EFa in CaV2.2, (ii) assess to what extent this rescues synaptic defects and ataxic-like behaviors in CaV2.1-deficient mice, and (iii) electrophysiological defects in iPSC-derived neurons carrying EA2 mutations.

**Anticipated output:** The overall purpose is to develop a new gene therapy approach for EA2. Because we take advantage of a general up-regulation of CaV2.2, rather than targeting individual mutations in CaV2.1, our approach is potentially suitable for counteracting the effects of all the mutations (>80) identified in EA2 patients.

Regolazione dello 'splicing' alternativo dei canali Ca<sup>2+</sup> mediante 'genome editing' di tipo CRISPR/Cas9 come potenziale terapia genica per l'ataxia episodica di tipo 2

**Scopi e obiettivi:** Scopo di questo progetto è aumentare l'espressione delle isoforme di 'splicing' del canale Ca<sup>2+</sup> CaV2.2 che sono più efficienti nel supportare la trasmissione sinaptica, compensando così il deficit di CaV2.1, che causa ataxia episodica di tipo 2 (EA2).

A tal fine, useremo la tecnica del 'genome editing' per regolare lo 'splicing' alternativo di CaV2.2 in modelli murini di EA2 e in neuroni derivati da cellule staminali pluripotenti (iPSCs) con mutazioni che causano EA2.

**Background/Motivazione:** In EA2, mutazioni 'loss-offunction' in CaV2.1 inducono un aumento compensativo dell'espressione di CaV2.2 e CaV2.3. Nonostante ciò, CaV2.2 e CaV2.3 non sono in grado di sostituire CaV2.1, probabilmente perché non sono così efficienti come CaV2.1 nel supportare

la trasmissione sinaptica.

Abbiamo recentemente scoperto che l'efficienza di CaV2.1 e CaV2.2 nel supportare la trasmissione sinaptica è regolata da un evento di 'splicing' che genera due isoforme alternative per ciascun canale (EFa ed EFb). Nel cervello, l'abbondanza relativa delle due isoforme differisce per i canali Ca<sup>2+</sup>: l'espressione di EFa - l'isoforma più efficiente nel supportare la trasmissione sinaptica - è alta per CaV2.1 ma bassa per CaV2.2 e CaV2.3.

Abbiamo ipotizzato che CaV2.2 (e possibilmente CaV2.3) potrebbero sostituire in modo più efficiente CaV2.1 se fosse possibile aumentare l'espressione delle loro isoforme di tipo EFa.

Esperimenti: (i) Utilizzeremo la tecnica del 'genome editing' di tipo CRISPR/Cas9 per cambiare l'abbondanza relativa delle isoforme EFa ed EFb a favore di EFa in CaV2.2 e (ii) analizzeremo quanto questa manipolazione recupera i difetti sinaptici e comportamenti di tipo atassico in topi che non esprimono il canale CaV2.1, e (iii) difetti elettrofisiologici in neuroni derivati da cellule iPSCs con mutazioni EA2.

Risultati previsti: Scopo generale di questo progetto è mettere a punto un nuovo approccio di terapia genica per EA2. Poiché sfruttiamo un aumento dell'espressione di CaV2.2, che avviene in tutti i casi di EA2, piuttosto che correggere singole mutazioni in CaV2.1, il nostro approccio è potenzialmente adatto a contrastare gli effetti di tutte le mutazioni (>80) identificate in pazienti con EA2.

Thalhammer, A., Contestabile, A., Ermolyuk, Y.S., Ng, T., Volynski, K.E., Soong, T.W., Goda, Y., and Cingolani, L.A. (2017). Alternative Splicing of P/Q-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Shapes Presynaptic Plasticity. Cell Rep 20, 333-343.

Atassia episodica tipo II

Coordinator: Lorenzo Cingolani

Partner: Federico Zara

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2020

**Telethon Project (nr):**

GGP19181

**Disease Name:**

Episodic Ataxia Type II

**Keywords:**

Alternative splicing, Gene editing, Ataxia

## Poster P.07.42

### RNA THERAPEUTICS FOR FRIEDREICH'S ATAXIA

Bon C.<sup>[2]</sup>, Luffarelli R.<sup>[1]</sup>, Russo R.<sup>[2]</sup>, Fortuni S.<sup>[1]</sup>, Pierattini B.<sup>[3]</sup>, Santulli C.<sup>[3]</sup>, Fimiani C.<sup>[2]</sup>, Persichetti F.<sup>[4]</sup>, Cotella D.<sup>[4]</sup>, Mallamaci A.<sup>[3]</sup>, Santoro C.<sup>[4]</sup>, Carninci P.<sup>[5]</sup>, Espinoza S.<sup>[2]</sup>, Testi R.<sup>[1]</sup>, Zucchelli S.<sup>[4]</sup>, Condò I.\*<sup>[1]</sup>, Gustincich S.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Rome "Tor Vergata" ~ Roma ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) ~ Genova ~ Italy, <sup>[3]</sup>International School for Advanced Studies (SISSA) ~ Trieste ~ Italy, <sup>[4]</sup>University of Piemonte Orientale ~ Novara ~ Italy, <sup>[5]</sup>RIKEN Center for Life Science Technologies ~ Yokohama ~ Japan

Friedreich's ataxia (FRDA) is an incurable disorder with neuro- and cardiodegenerative progression. This monogenic disease is caused by the expansion of naturally occurring GAA repeat in the first intron of the FXN gene, encoding for frataxin, a protein implicated in the biogenesis of iron-sulfur clusters, in iron metabolism and in stress-induced apoptosis. As the genetic defect interferes with FXN transcription, FRDA patients express a normal frataxin protein but at insufficient levels. Thus, current therapeutic strategies in FRDA are mostly aimed to restore physiological frataxin expression by targeting FXN transcription. In this scenario, RNA therapeutics could represent an appealing approach to induce a gene-specific activation. Among regulatory RNAs, a new functional class of antisense long non-coding RNAs (lncRNAs) acting as enhancers of target mRNA translation was previously described. The activity of this lncRNAs requires an inverted SINEB2 sequence to increase translation (Effector Domain; ED) and an overlapping region to target its sense mRNA (Binding Domain; BD): this class of RNAs was designated as SINEUPs. Here, by in vitro screening, we have identified a number of synthetic SINEUPs targeting human FXN mRNA (SINEUP-FXNs) and capable to up-regulate frataxin protein acting at the post-transcriptional level in human cells. Subsequently, a second generation of optimized RNAs, with a shorten structure and named miniSINEUP-FXNs, was tested on endogenous mRNA in FRDA patient-derived cells. Some miniSINEUP-FXNs variants demonstrated to be the best candidates for subsequent investigations and intriguingly achieved frataxin protein restore to physiological levels. More importantly, our results indicated a consistent recovery of disease-associated aconitase defects in FRDA patient-derived cells. Collectively, we provide evidence that SINEUPs may be a gene-specific therapeutic approach to activate frataxin translation in FRDA.

### TERAPIA A BASE DI RNA PER L'ATASSIA DI FRIEDREICH

L'ataxia di Friedreich (AF) è una patologia neurodegenerativa e cardiodegenerativa per la quale non esiste ancora una terapia efficace. Questa malattia è causata da mutazioni nel gene che produce la frataxina, una proteina coinvolta nel metabolismo del ferro e nella protezione dagli stress che inducono la morte cellulare. Il difetto genetico nei pazienti con AF non causa la produzione di una frataxina malfunzionante, ma ne determina invece una quantità insufficiente rispetto alle cellule sane. Per questo motivo, la maggior parte delle terapie sperimentali per il trattamento dell'AF sono concepite per aumentare le quantità di frataxina stimolando il processo chiamato "trascrizione genica". Negli ultimi anni è stata scoperta una grande categoria di molecole, chiamate "RNA non codificanti", che svolgono un ruolo importante nei molti processi che permettono ad un gene di produrre la rispettiva proteina. Una particolare tipologia di questi RNA, denominati SINEUP, sono in grado di aumentare la quantità di una determinata proteina stimolando il processo chiamato "sintesi proteica". Il nostro studio ha avuto lo scopo di verificare se fosse possibile una nuova terapia sperimentale per l'AF, creando

delle molecole SINEUP in grado di far aumentare in maniera specifica la sintesi proteica della frataxina. In questo modo, abbiamo identificato delle SINEUP capaci di far produrre maggiori quantità di frataxina quando somministrate a cellule umane normali (SINEUP-FXN). Successivamente, abbiamo creato delle varianti ottimizzate per l'utilizzo terapeutico (miniSINEUP-FXN), la cui efficacia è stata valutata dopo somministrazione in cellule derivate da pazienti con AF. Abbiamo così dimostrato che diverse di queste molecole di RNA sintetico riescono ad aumentare la quantità di frataxina nelle cellule di paziente, arrivando a livelli molto simili a quelli presenti in cellule sane. Inoltre, i nostri risultati indicano che le cellule di paziente trattate in questo modo possono recuperare la funzionalità delle aconitasi, uno dei marcatori tipicamente carenti nell'AF.

None

Atassia di Friedreich

Coordinator: Stefano Gustincich

Partners: Ivano Condò, Antonello Mallamaci

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15004

**Disease Name:**

Friedreich's Ataxia

**Keywords:**

Friedreich's Ataxia, SINEUPs, Frataxin



## 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.<sup>[2]</sup>, Consalez G.<sup>[3]</sup>, Filippo C.<sup>[3]</sup>, Croci L.<sup>[3]</sup>, Micalizzi A.<sup>[4]</sup>, Nuovo S.<sup>[5]</sup>, Ginevrino M.<sup>[5]</sup>, Romani M.<sup>[6]</sup>, Zanni G.<sup>[1]</sup>, **Bertini E.\*<sup>[1]</sup>**

<sup>[1]</sup>Laboratorio di Medicina Molecolare, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma ~ Rome ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dept. of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, 27100, Italy; ~ Pavia ~ Italy, <sup>[3]</sup>2Divisione di Neuroscienze, IRCCS San Raffaele, Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[4]</sup>Unita' di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma ~ Rome ~ Israel, <sup>[5]</sup>Neurogenetics Unit, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome, 00143, Italy ~ Rome ~ Italy, <sup>[6]</sup>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%), AHI1 (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, Ghomid 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

## 08\_Genetic neurological disorder\Epilepsy and Seizures

## Poster P.08.44

### DELINEATING THE MOLECULAR PATHWAY AND PATHOGENIC MECHANISM UNDERLYING AUTOSOMAL DOMINANT LATERAL TEMPORAL EPILEPSY (ADLTE)

Dazzo E.<sup>[1]</sup>, Baldassari S.<sup>[2]</sup>, Fruscione F.<sup>[2]</sup>, Sterlini B.<sup>[3]</sup>, Corradi A.<sup>[4]</sup>, Romei A.<sup>[4]</sup>, Benfenati F.<sup>[4]</sup>, Zara F.<sup>[2]</sup>, Nobile C.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>CNR-Neuroscience Institute ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute G. Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Genoa ~ Genova ~ Italy, <sup>[4]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy

Autosomal dominant lateral temporal epilepsy (ADLTE; OMIM 600512) is a genetically heterogeneous focal epileptic syndrome clinically characterized by seizures with prominent auditory symptoms (1). We previously identified mutations causing ADLTE in the brain-expressed LGI1 and Reelin genes, both encoding secreted proteins. Altogether, these genes are mutated in about 50% of families (2). As part of this Telethon project, we recently identified the third ADLTE-causing gene, MICAL-1, which encodes a cytoplasmic protein that modulates actin cytoskeleton dynamics, suggesting dysregulation of actin cytoskeleton remodeling in neurons as a likely pathogenic mechanism underlying ADLTE (3). There is no biochemical or functional evidence in the literature linking Lgi1 and Reelin proteins or signaling pathways. We found evidence that Lgi1 and Reelin directly interact in different cell lines overexpressing Lgi1, or an Lgi1-glycophosphatidylinositol fusion protein, by double immunofluorescence and co-immunoprecipitation experiments. Moreover, we found that Lgi1 interacts with the N- and C-terminal Reelin regions but not with the central region containing the binding sites for the canonical Reelin receptors ApoER2 and VLDLR. Thus, Lgi1 and Reelin may act together to regulate the molecular pathway underlying ADLTE.

To study the effects of Reelin mutations, we developed a cell-based secretion test, which showed that ADLTE-causing mutations abolish or strongly reduce secretion of Reelin in heterologous cells. Moreover, we found evidence that this loss-of-function effect results from impaired trafficking of mutant proteins through the Golgi apparatus and protein degradation due to activation of the autophagy pathway, as shown by accumulation of autophagy markers p62 and LC3 in the cells. These results provide evidence for a common mechanism to the various Reelin mutations, implying retention of misfolded mutant proteins at the endoplasmic reticulum followed by their rapid degradation.

We also aim to study the effect of LGI1 mutations on neuronal morphology and maturation by studying the phenotype of human neurons (iN) differentiated from induced pluripotent stem cells of 3 patients (4,5,6) at different days of differentiation (DIV):7,14,21,35,45. A non-significant reduction of LGI1 cellular expression in iNs lysates was observed in the late time-points by Western Blot (WB), whereas a reduction of the secreted protein was observed in the medium by ELISA at 35-45DIV for mutant genotypes. Morphological Sholl analysis showed a slight retardation in the dendritic organization and smaller soma size were observed at 7-14DIV, that were rescued at later DIV. We also counted pre- and post-synaptic boutons by immunofluorescence (IF)(7) and found no significant alterations in patients compared to the controls. Normal expression of synaptic proteins was also detected by WB. Our data showed no morphological abnormalities underlying LGI1 mutations.

L'epilessia temporale laterale autosomica dominante (ADLTE; OMIM 600512) è una sindrome epilettica familiare caratterizzata clinicamente da crisi epilettiche con sintomi uditivi (1). In precedenza, il nostro gruppo identificò mutazioni che causano l'ADLTE in due geni espressi nel cervello, LGI1 e

Reelin, che codificano per proteine secrete. Complessivamente, questi due geni sono mutati in circa il 50% delle famiglie (2). Come parte di questo progetto Telethon, abbiamo di recente identificato il terzo gene causativo dell'ADLTE, MICAL-1, che codifica per una proteina implicata nella regolazione del citoscheletro cellulare, suggerendo il malfunzionamento del rimodellamento del citoscheletro nei neuroni come probabile meccanismo patogenetico dell'ADLTE (3).

Finora, non sono state riportate interazioni biochimiche o funzionali tra Lgi1 e Reelin. Abbiamo trovato evidenze che Lgi1 e Reelin interagiscono direttamente in diverse linee cellulari che esprimono Lgi1 mediante esperimenti di doppia immunofluorescenza e co-immunoprecipitazione. Inoltre, abbiamo trovato che Lgi1 interagisce con le regioni N- e C-terminale di Reelin, ma non con la regione centrale che contiene i siti di legame per i recettori canonici di Reelin, ApoER2 e VLDLR. Questi risultati indicano che Lgi1 e Reelin potrebbero agire insieme per regolare il meccanismo molecolare alla base dell'ADLTE.

Per studiare gli effetti delle mutazioni in Reelin, abbiamo messo a punto un test di secrezione da cellule in coltura, il quale ha dimostrato che mutazioni responsabili dell'ADLTE aboliscono o riducono fortemente la secrezione di Reelin in cellule eterologhe. Inoltre, abbiamo trovato che questa perdita di funzione è il risultato di un blocco del traffico delle proteine mutate lungo la via secretoria e della conseguente degradazione delle proteine mutate dovuta alla attivazione del meccanismo della autofagia. Questi risultati dimostrano l'esistenza di un meccanismo comune alle varie mutazioni di Reelin, che implica la rapida degradazione delle proteine mutate strutturalmente anomale.

Abbiamo analizzato l'effetto delle mutazioni di LGI1 sulla morfologia e la maturazione neuronale studiando il fenotipo dei neuroni umani (iN) differenziati dalle cellule staminali pluripotenti indotte di 3 pazienti (4,5,6), a diversi giorni di differenziamento (DIV): 7,14,21,35,45. È stata osservata una riduzione non significativa dell'espressione cellulare di LGI1 su lisati di iNs nei pazienti mediante Western Blot (WB) mentre è stata osservata una riduzione della proteina secreta a 35-45DIV, mediante ELISA. L'analisi morfologica Sholl ha mostrato un leggero ritardo nell'organizzazione dendritica e nelle dimensioni del soma a 7-14DIV, recuperata tuttavia nei DIV successivi. Inoltre non abbiamo riscontrato alterazioni significative nel numero di bottoni pre- e post-sinaptici nei pazienti rispetto ai controlli mediante immunofluorescenza (IF) (7) e nell'espressione di numerose proteine sinaptiche mediante WB.

1) Michelucci R, Nobile C. Autosomal Dominant Epilepsy with Auditory Features. 2007 Apr 20 [Updated 2019 Jan 10]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1537/>

2) Michelucci R, Pulitano P, Di Bonaventura C, Binelli S, Luisi C, Pasini E, Striano S, Striano P, Coppola G, La Neve A, Giallonardo AT, Mecarelli O, Seroli E, Dazzo E, Fanciulli M, Nobile C. The clinical phenotype of autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy related to reelin mutations. *Epilepsy and Behavior* 68:103-107, 2017.

3) Dazzo E, Rehberg K, Michelucci R, Passarelli D, Boniver C, Vianello Dri V, Striano P, Striano S, Pasterkamp RJ, Nobile C. Mutations in MICAL-1 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Annals of Neurology* 83:483-493, 2018.

4) Striano P, Busolin G, Santulli L, Leonardi E, Coppola A, Vitiello L, Rigon L, Michelucci R, Tosatto SC, Striano S, Nobile C. Familial temporal lobe epilepsy with psychic auras associated with a novel LGI1 mutation. *Neurology*. 76:1173-1176, 2011.

5) Di Bonaventura C, Operto FF, Busolin G, Egeo G, D'Aniello A, Vitello L, Smaniotto G, Furlan S, Diani E, Michelucci R, Giallonardo AT, Coppola G, Nobile C. Low penetrance and effect on

protein secretion of LGI1 mutations causing autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsia*. 52:1258-1264, 2011.

6) Pizzuti A, Flex E, Di Bonaventura C, Dottorini T, Egeo G, Manfredi M, Dallapiccola B, Giallonardo AT. Epilepsy with auditory features: a LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Ann Neurol*. 53: 396-399, 2003 . Erratum in: *Ann Neurol*. 54:137, 2003.

7) Lovero KL, Fukata Y, Granger AJ, Fukata M, Nicoll RA. The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112: E4129-4137, 2015.

Epilessia temporale laterale autosomica dominante

Coordinator: Carlo Nobile

Partner: Federico Zara

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15229

**Disease Name:**

Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy

**Keywords:**

Temporal lobe epilepsy, Reelin, iPSC

## Poster P.08.45

### PROTEIN SUBSTITUTION THERAPY: A PROMISING TREATMENT FOR CDKL5 DEFICIENCY DISORDER

**Medici G.\*<sup>[1]</sup>**, Trazzi S.<sup>[1]</sup>, De Franceschi M.<sup>[1]</sup>, Fuchs C.<sup>[1]</sup>, Loi M.<sup>[1]</sup>, Gennaccaro L.<sup>[1]</sup>, Galvani G.<sup>[1]</sup>, Tassinari M.<sup>[1]</sup>, Giustetto M.<sup>[2]</sup>, Kilstrup--Nielsen C.<sup>[3]</sup>, Pizzorusso T.<sup>[4]</sup>, Ciani E.<sup>[1]</sup>, Ren E.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>1- Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna ~ Bologna ~ Italy, <sup>[2]</sup>2- Department of Neuroscience, University of Turin ~ Turin ~ Italy, <sup>[3]</sup>3- Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria ~ Busto Arsizio ~ Italy, <sup>[4]</sup>4- Department of Neuroscience, Psychology, Drug Research and Child Health NEUROFARBA University of Florence ~ Florence ~ Italy

Cyclin-dependent kinase like-5 (CDKL5) deficiency disorder (CDD) is a rare and severe neurodevelopmental disease caused by mutations in the CDKL5 gene, located in the X-chromosome. The consequent unsuccessful CDKL5 protein expression in the nervous system leads to a severe phenotype characterized by intellectual disability, early-onset intractable epilepsy, motor impairment, and reduced visual acuity which, together with a complex corollary symptomatology, resembles Rett syndrome. Currently, there is no cure or effective treatment for CDD, and the mainstay of care for this disorder is support for the families. Therefore, identification of specific therapies will represent an important achievement in the field of public health.

In theory, for a monogenic disease such as CDD, delivery of a wild type copy of the CDKL5 protein to cells lacking functional CDKL5 represents a therapeutic approach worth considering. However, the failure of proteins to penetrate the cell membrane prevents their use as a therapeutic tool in monogenic disorders. Importantly, it has been reported that a protein transduction domain (TAT) is able to deliver macromolecules into cells and even into the brain when fused to a given protein. Based on these premises the aim of this study was to develop a TAT-CDKL5 protein substitution therapy for CDD in order to compensate for the lack of function of the CDKL5 protein.

We demonstrated that TAT-CDKL5 fusion protein is efficiently internalized by target cells and retains CDKL5 activity. When injected in vivo, TAT-CDKL5 fusion protein was able to cross the blood–brain barrier and diffuse into brain cells. Importantly, Cdkl5 KO mice treated with TAT-CDKL5 protein underwent a neurodevelopmental and behavioral improvement or even rescue. These promising results suggest that a protein substitution therapy with a TAT-CDKL5 fusion protein may be a successful therapy for CDD.

Terapia proteica sostitutiva: un trattamento promettente per il disordine CDKL5

Il disordine CDKL5 (Cyclin-dependent kinase like-5) è una rara e grave malattia del neurosviluppo causata da mutazioni nel gene CDKL5, localizzato sul cromosoma X. La conseguente mancata espressione della proteina CDKL5 nel sistema nervoso centrale porta allo sviluppo di un fenotipo clinico molto grave, caratterizzato da disabilità intellettiva, epilessia ad esordio precoce, problemi motori, e ridotta capacità visiva; sintomi principali di un quadro clinico che ricalca in parte quello della Sindrome di Rett. Al momento non esistono cure per il trattamento del disordine CDKL5 e l'unico sostegno possibile rimane il supporto alle famiglie. La scoperta di terapie efficaci rappresenta quindi un obiettivo fondamentale nel campo della salute pubblica.

Per una patologia monogenica quale il disordine CDKL5, fornire alle cellule malate una copia sana della proteina CDKL5 potrebbe rappresentare un valido approccio di cura. Tuttavia, la difficoltà delle proteine di superare la membrana cellulare ha impedito il loro uso come agenti terapeutici efficaci. A



tal riguardo, è stato recentemente scoperto che un piccolo peptide di trasduzione (TAT) sarebbe capace di favorire l'entrata di macromolecole nelle cellule e persino nel cervello quando fuso alla proteina di interesse. Considerando queste premesse, l'obbiettivo dello studio è stato quello di sviluppare una terapia proteica sostitutiva basata sulla proteina di fusione TAT-CDKL5 e volta a compensare l'assenza della proteina nel disordine CDKL5.

Abbiamo dimostrato che la proteina di fusione TAT-CDKL5 è efficientemente internalizzata nelle cellule bersaglio e mantiene la sua attività biologica. Quando iniettata in vivo, la proteina di fusione è capace di attraversare la barriera ematoencefalica e diffondere nelle cellule nervose. Inoltre, il trattamento con TAT-CDKL5 in topi che mimano la patologia umana, i topi KO per CDKL5, porta ad un netto miglioramento del comportamento associato ad un miglioramento del neurosviluppo.

Questi promettenti risultati suggeriscono che una terapia proteica sostitutiva, con la proteina di fusione TAT-CDKL5, potrebbe rappresentare un efficace trattamento del disordine CDKL5.

Flinterman M, Farzaneh F, Habib N, Malik F, Gaken J, Tavassoli M (2009) Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products. *Mol Ther* 17:334-342.

Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kubart S, Menzel C, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Eyre H, Harbord M, Haan E, Sutherland GR, Ropers HH, Gecz J (2003) Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *American journal of human genetics* 72:1401-1411.

Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns JP, Schwinger E, Gecz J, Ropers HH, Kalscheuer VM (2004) Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *American journal of human genetics* 75:1149-1154.

Trazzi S, De Franceschi M, Fuchs C, Bastianini S, Viggiano R, Lupori L, Mazziotti R, Medici G, Lo Martire V, Ren E, Rimondini R, Zoccoli G, Bartesaghi R, Pizzorusso T, Ciani E (2018) CDKL5 protein substitution therapy rescues neurological phenotypes of a mouse model of CDKL5 disorder. *Hum Mol Genet* 27:1572-1592.

Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, Evans J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PP, Watson C, Lahooti H, Ellaway CJ, Bennetts B, Leonard H, Gecz J (2004) Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *American journal of human genetics* 75:1079-1093.

Disordine CDKL5

Coordinator: Elisabetta Ciani

Partners: Maurizio Giustetto, Charlotte Kilstrup-Nielsen, Tommaso Pizzorusso

Duration (N. Years): 3

**Telethon Project (nr):**

GGP15098

**Disease Name:**

CDKL5 Deficiency Disorder

**Keywords:**

CDKL5, Protein substitution therapy, monogenic

## Poster P.08.46

### TOWARD GENE THERAPY FOR DRAVET SYNDROME: UNCOVERING DYNAMICS OF REVERSIBILITY AND MECHANISMS OF SCN1A GENE MODULATION

Valassina N.<sup>[2]</sup>, Brusco S.<sup>[2]</sup>, Indrigo M.<sup>[2]</sup>, Broccoli V.<sup>[2]</sup>, Colasante G.<sup>\*[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Ospedale San Raffaele ~ Coordinator ~ Italy, <sup>[2]</sup>Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy

**Broad objectives:** The project aims to investigate the degree of symptomatic reversibility in a new mouse model of Dravet Syndrome (DS) and to deepen the knowledge on factors and chromatin dynamics regulating Scn1a gene expression.

**Background/Rationale:** DS is a severe infantile epilepsy that begins during the first year of life and leads to severe cognitive and social interaction deficits. It is mostly caused by heterozygous loss-of-function mutations in the SCN1A gene, which encodes for the alpha-subunit of the voltage-gated sodium channel (Nav1.1) and is responsible of GABAergic interneuron excitability. To date, no effective cure is available for DS patients. Innovative therapeutic approaches based on up-regulation of healthy allele of Scn1a to re-establish sufficient levels of GABAergic inhibition are being developed. However, important information on the degree of reversibility of DS, upon restoration of Nav1.1 physiological level, are lacking. Also, poor knowledge on the molecular events regulating Scn1a gene expression is available.

**Research design and methods for achieving the stated objectives**

We will exploit a recently developed reversible DS mouse model to investigate the degree of reversibility of the syndrome upon restoration of the effective physiological levels of Nav1.1 after symptom onset. We will systemically deliver different titers of adeno-associated vectors (AAV) expressing CRE recombinase under different neuronal subtypes specific promoters in Scn1a flox-STOP/+ mice and assess the severity of DS phenotype.

Moreover, we will perform in-situ capture of chromatin interactions by biotinylated dCas9 on Scn1a promoter before and after the expression of the gene in murine interneurons.

**Anticipated output:** We will collect observations on the reversibility of DS and set the minimal number/subtype of transduced neurons and time-window useful for therapy delivery. Also, we will highlight new modulators of Scn1a transcription that may become target of new therapeutic approaches.

Verso la terapia genica per la sindrome di Dravet: reversibilità della malattia e meccanismi di modulazione del gene Scn1a

La Sindrome di Dravet (DS) è una grave epilessia infantile che inizia durante il primo anno di vita e porta a serie alterazioni cognitive e sociali. È causata da mutazioni eterozigoti nel gene SCN1A, che codifica per la subunità alfa del canale del sodio voltaggio (Nav1.1) ed è responsabile dell'attività degli interneuroni inibitori (GABAergici). Ad oggi, non è disponibile una cura efficace per i pazienti con DS. Si stanno sviluppando approcci terapeutici innovativi basati sulla super attivazione dell'allele sano di Scn1a per ristabilire livelli sufficienti di inibizione nei circuiti. Tuttavia, mancano importanti informazioni sul grado di reversibilità della sindrome dopo il ripristino del livello fisiologico di Nav1.1. Inoltre, i meccanismi che regolano l'espressione del gene Scn1a sono poco conosciuti.

Sfrutteremo un nuovo modello di topo della Sindrome di Dravet recentemente sviluppato per studiare il grado di reversibilità della patologia dopo il ripristino dei livelli fisiologici di Nav1.1, quando i sintomi

sono già presenti. Inoltre, eseguiremo studi d'avanguardia sul promotore del gene per chiarire le interazioni e i fattori che regolano l'espressione del gene Scn1a negli interneuroni. Questo studio permetterà di raccogliere osservazioni sulla reversibilità della DS e chiarire la finestra temporale utile per l'erogazione della terapia. Inoltre, definiremo nuovi modulatori della trascrizione Scn1a che potrebbero diventare bersaglio di nuovi approcci terapeutici.

-

Sindrome di Dravet

Coordinator: Gaia Colasante

Duration (N. Years): 3 years

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19249

**Disease Name:**

Dravet Syndrome

**Keywords:**

Gene therapy, epilepsy, Dravet Syndrome

## Poster P.08.47

### RESCUING EPILEPSY ASSOCIATED WITH SYN1 AND SCN1A GENE MUTATIONS BY INHIBITING EEF2K/EEF2 PATHWAY

**Beretta S.**<sup>[1]</sup>, Gritti L.<sup>[1]</sup>, Ponzoni L.<sup>[2]</sup>, Scalmani P.<sup>[3]</sup>, Mantegazza M.<sup>[4]</sup>, Sala M.<sup>[1]</sup>, Verpelli C.<sup>[1]</sup>, Sala C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>CNR Neuroscience Institute, Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>U.O. of Neurophysiopathology and Diagnostic Epileptology, Fondazione Istituto di Ricerca e Cura a Carattere Scientifico Neurological Institute Carlo Besta ~ Milano ~ Italy, <sup>[4]</sup>Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, CNRS UMR7275 and University of Nice-Sophia Antipolis ~ Valbonne ~ France

Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2K) is a ubiquitous Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline-dependent kinase that regulates protein translation by catalyzing the phosphorylation of eEF2 at Thr56. In neurons, eEF2K is activated by Ca<sup>2+</sup> influx via glutamate receptors stimulation and modulates the expression of certain proteins involved in synapse formation and plasticity.

We recently demonstrated that eEF2K activity regulates the excitation/inhibition ratio in the brain. In particular, eEF2K<sup>-/-</sup> mice display enhanced GABAergic transmission and tonic inhibition and are less susceptible to epileptic seizures. Accordingly, we propose eEF2K/eEF2 pathway as a possible target for antiepileptic therapies.

Importantly, we found that both genetic deletion and pharmacological inhibition of eEF2K can reduce epilepsy in two models of human genetic epilepsy, the Synapsin I knock-out mice (Syn1<sup>-/-</sup>) (Heise et al, 2017) and the voltage-gated sodium channel (Scn1a) knock-out mice (Scn1a<sup>+/-</sup>), the animal model of Dravet syndrome. We also found that the activity of eEF2K/eEF2 pathway (measured by the levels of phospho-eEF2) is enhanced in these two genetic mouse models of epilepsy and also in a pharmacologically induced model of epilepsy. Therefore, the alteration of this pathway might represent a common molecular epileptogenic mechanism responsible for the hyperexcitability of the neuronal network described in epilepsy.

Using the Scn1a<sup>+/-</sup> mice, we also found that motor coordination defect, memory impairments, and stereotyped behavior are reverted by eEF2K deletion. The analysis of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) suggested that the rescue of the pathological phenotype was driven by the potentiation of the GABAergic synapses. Thus our data indicate that the pharmacological inhibition of eEF2K could represent a novel therapeutic strategy for treating epilepsy and related comorbidities.

RECUPERO DALLA PATOLOGIA EPILETTICA INDOTTA DA MUTAZIONI DEI GENI SYN1 E SCN1A TRAMITE INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA CHINASI eEF2K.

La chinasi eucariotica del fattore di allungamento 2 (eEF2K) è una chinasi Ca<sup>2+</sup>/calmodulina dipendente che regola la traduzione delle proteine catalizzando la fosforilazione di eEF2. Nei neuroni, eEF2K viene attivata dall'afflusso di Ca<sup>2+</sup> attraverso la stimolazione dei recettori del glutammato e modula l'espressione di alcune proteine coinvolte nella formazione e plasticità delle sinapsi. Abbiamo recentemente dimostrato che l'attività di eEF2K regola il rapporto di eccitazione/inibizione nel cervello. In particolare, i topi eEF2K<sup>-/-</sup> mostrano una migliore trasmissione GABAergica e sono meno sensibili alle convulsioni epilettiche. Di conseguenza, i nostri dati suggeriscono eEF2K come possibile target farmacologico per le terapie antiepilettiche. Abbiamo, infatti, dimostrato che sia la delezione genetica che l'inibizione farmacologica di eEF2K possono ridurre l'epilessia in due modelli murini di epilessia genetica umana, i topi knock-out per Synapsin I (Syn1<sup>-/-</sup>) (Heise et al, 2017) e i topi knock-out per il

canale al sodio voltaggio dipendente Scn1a (Scn1a+/-). Abbiamo anche scoperto che l'attività di eEF2K (misurata dai livelli di fosfo-eEF2) è potenziata in questi due modelli murini di epilessia. Usando i topi Scn1a +/-, abbiamo anche scoperto che il difetto di coordinazione motoria, i problemi di memoria e il comportamento stereotipato sono ripristinati dalla inibizione di eEF2K. L'analisi delle correnti postsinaptiche inibitorie spontanee (sIPSC) ha suggerito che il recupero del fenotipo patologico è mediato dal potenziamento delle sinapsi GABAergiche. Pertanto, i nostri dati indicano che l'inibizione farmacologica di eEF2K potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per il trattamento dell'epilessia e delle co-morbilità correlate.

Heise C, Taha E, Murru L, Ponzoni L, Cattaneo A, Guarnieri FC, Montani C, Mossa A, Vezzoli E, Ippolito G, Zapata J, Barrera I, Ryazanov AJ, Cook J, Poe M, Stephen M, Kopanitsa M, Benfante R, Rusconi F, Braida D, Francolini M, Proud CG, Valtorta F, Passafaro M, Sala M, Bachi A, Verpelli C, Rosenblum K, Sala C (2017) eEF2K/eEF2 pathway controls the excitation/inhibition balance and susceptibility to epileptic seizures Cereb Cortex Cereb Cortex, 27: 2226-2248

Epilessia, disabilità intellettiva

Coordinator: Carlo Sala

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GGP17176

**Disease Name:**

Epilepsy, Intellectual Disability

**Keywords:**

Synaptic Transmission, Protein Translation, Epilepsy

## Poster P.08.48

### **SOLVING THE PUZZLE OF PROTOCADHERIN-19 MOSAICISM TO UNDERSTAND THE PATHOPHYSIOLOGY OF PCDH19 FEMALE EPILEPSY (PCDH19-FE)**

Mazzoleni S.<sup>[1]</sup>, Lamers D.<sup>[2]</sup>, Murru L.<sup>[3]</sup>, Passafaro M.<sup>[3]</sup>, Ratto G.M.<sup>[2]</sup>, Bassani S.\*<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>CNR, Institute of Neuroscience and Biometra Dept., University of Milan ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>NEST, Scuola Normale Superiore and Istituto Nanoscienze CNR ~ Pisa ~ Italy, <sup>[3]</sup>CNR, Institute of Neuroscience ~ Milano ~ Italy

Mutations in the X-linked gene PCDH19 cause early infantile epileptic encephalopathy-9 (EIEE9), a neurodevelopmental disorder characterized by clusters of seizures with onset in infancy, intellectual disability and autistic features (Dibbens et al. 2008; Kolc et al., 2018). The peculiarity of EIEE9 is that it affects females with PCDH19 heterozygous mutations while it spares males, with the exception of somatic mosaic males (de Lange et al. 2017). Therefore, a cell-interference model has been proposed (Depienne et al. 2009), according to which the coexistence of PCDH19-positive and PCDH19-negative neurons would scramble cell-cell communication and neuronal network functioning.

To validate this hypothesis and investigate EIEE9 underpinning mechanisms, we exploited two models of PCDH19 mosaicism by using the PCDH19 floxed mouse generated in the laboratory: the Cre recombinase was delivered either locally in the cortex of postnatal mice, by injection of adeno-associated vectors (AAVs), or in the whole brain, by crossing PCDH19 floxed mice with hSyn1-Cre mice to prevent PCDH19 expression from the embryonic development.

In vivo electrophysiological studies in anesthetized mice show that a PCDH19 mosaic patch in the visual cortex is associated with the disruption of slow wave activity (SWA) and causes transient episodes of hyperexcitability and hypersynchronous activity. Combined local field potential (LFP) recordings and two-photon calcium imaging suggest that some mosaic mice display an increased calcium activity likely to be associated to the transient hyperexcitability.

The mosaic expression of PCDH19 in the progeny of PCDH19 floxed X hSyn1-Cre is visible not only in heterozygous females, as expected, but also in hemizygous males, most likely as a result of the incomplete enzymatic action of the Cre recombinase, and this will allow the comparison of PCDH19 mosaic effects between genders. Interestingly, mosaic KO females display a transient growth delay between the 3rd and 4th postnatal week, suggesting a potential critical time-window in which to reconfirm brain hyperexcitability in this model. With this regard, the surface expression of the alpha1 subunit of GABAA receptor, which mediates fast inhibitory transmission, is reduced in the brain of KO mosaic mice. Furthermore, preliminary data on hippocampal slices from adult mosaic KO females indicate that long-term potentiation (LTP) is impaired. Ongoing and future experiments aim at elucidating both the causes of the hyperexcitability in PCDH19 mosaic models and the consequences of this phenotype on circuit functioning and mice behavior.

### STUDIO DEL RUOLO DEL MOSAICISMO NELLA PATOFISIOLOGIA DELL'EPILESSIA FEMMINILE PCDH19-DIPENDENTE

Mutazioni nel gene del cromosoma X PCDH19 causano una sindrome del neurosviluppo nota come encefalopatia epilettica infantile precoce-9 (EIEE9), caratterizzata da epilessia, deficit cognitivi e disturbi dello spettro autistico (Dibbens et al. 2008; Kolc et al., 2018).

La patologia colpisce esclusivamente le bambine con un allele di PCDH19 mutato, mentre risparmia i

maschi portatori, ad eccezione di rari casi di bambini con un mosaicismo somatico di PCDH19 a causa di mutazioni post-zigotiche (de Lange et al. 2017). Per questo è stato ipotizzato un meccanismo di “interferenza cellulare” (Depienne et al. 2009), secondo il quale l’elemento scatenante della patologia sarebbe la co-esistenza nel cervello di due popolazioni eterogenee di cellule, alcune esprimenti la forma selvatica di PCDH19, altre la forma mutata. Questo mosaicismo comprometterebbe la comunicazione tra le cellule e il funzionamento dei circuiti cerebrali.

Per validare questa ipotesi abbiamo sfruttato un modello di topo transgenico generato nel laboratorio nel quale è possibile spegnere, tramite l’enzima ricombinasi Cre, l’espressione del gene PCDH19 in aree specifiche del cervello e a tempi diversi dello sviluppo.

Abbiamo osservato come sia sufficiente riprodurre in fase post-natale un mosaico di PCDH19 in un’area circoscritta della corteccia cerebrale per compromettere la normale attività elettrica del cervello e osservare fenomeni di ipereccitabilità e ipersincronizzazione dei neuroni, caratteristiche associate con la maggior suscettibilità a crisi epilettiche.

Abbiamo inoltre studiato topi caratterizzati da un mosaico di PCDH19 fin dallo sviluppo embrionale ed esteso all’intero cervello. Questi topi mostrano un rallentamento transitorio della crescita in fase postnatale, che ipotizziamo corrisponda ad una finestra critica in cui riconfermare e approfondire gli effetti del mosaicismo sull’ipereccitabilità neuronale. In età adulta, i topi mostrano difetti di plasticità sinaptica tipicamente associati a disturbi di apprendimento e memoria.

Le prime analisi biochimiche suggeriscono inoltre che, alla base del fenotipo di ipereccitabilità osservato, vi sia un difetto nella trasmissione GABAergica, in quanto il recettore per il neurotrasmettitore GABA di tipo A (GABA<sub>A</sub>R) risulta meno espresso sulla superficie delle cellule cerebrali dei topi mosaico, rispetto ai topi selvatici.

Con i prossimi esperimenti approfondiremo la caratterizzazione dei modelli murini, cercando di scoprire le cause e conseguenze dell’ipereccitabilità dei topi mosaico per PCDH19.

1) de Lange, I.M., Rump, P., Neuteboom, R.F., Augustijn, P.B., Hodges, K., Kistemaker, A.I., Brouwer, O.F., Mancini, G.M.S., Newman, H.A., Vos, Y.J., et al. (2017). Male patients affected by mosaic PCDH19 mutations: five new cases. *Neurogenetics* 18, 147-153.

2) Depienne, C., Bouteiller, D., Keren, B., Cheuret, E., Poirier, K., Trouillard, O., Benyahia, B., Quelin, C., Carpentier, W., Julia, S., et al. (2009). Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet* 5, e1000381.

3) Dibbens, L.M., Tarpey, P.S., Hynes, K., Bayly, M.A., Scheffer, I.E., Smith, R., Bomar, J., Sutton, E., Vandeleur, L., Shoubridge, C., et al. (2008). X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nat Genet* 40, 776-781.

4) Kolc, K.L., Sadleir, L.G., Scheffer, I.E., Ivancevic, A., Roberts, R., Pham, D.H., and Gecz, J. (2018). A systematic review and meta-analysis of 271 PCDH19-variant individuals identifies psychiatric comorbidities, and association of seizure onset and disease severity. *Mol Psychiatry*.

Encefalopatia epilettica infantile precoce 9 (EIEE9)

Coordinator: Silvia Bassani  
Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GGP17260

**Disease Name:**

Epileptic Encephalopathy Early Infantile 9 (EIEE9)

**Keywords:**

PCDH19, Epilepsy, Cognitive impairment



## Poster P.08.49

### DISSECTING THE ARISTALESS-RELATED HOMEBOX EPILEPSY PATH TO FIND DRUGGABLE TARGET MOLECULES

Poeta L.<sup>[1]</sup>, Verrillo L.<sup>[1]</sup>, Drongitis D.<sup>[1]</sup>, Tuccillo M.<sup>[1]</sup>, Filosa S.<sup>[3]</sup>, Zucchelli S.<sup>[2]</sup>, Collombat P.<sup>[4]</sup>, Gecz J.<sup>[5]</sup>, Gustincich S.<sup>[6]</sup>, Acampora D.<sup>[1]</sup>, Di Schiavi E.<sup>[3]</sup>, Altucci L.<sup>[7]</sup>, Miano M.G.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Institute of Genetics and Biophysics "Adriano Buzzati Traverso", CNR, Naples, Italy ~ Naples ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy ~ Novara ~ Italy, <sup>[3]</sup>Institute of Biosciences and BioResources, CNR, Naples, Italy ~ Naples ~ Italy, <sup>[4]</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Nice, France ~ Nice ~ France, <sup>[5]</sup>Faculty of Health and Medical Sciences, The University of Adelaide, Adelaide, Australia ~ Adelaide ~ Australia, <sup>[6]</sup>Italian Institute of Technology – IIT, Genova, Italy ~ Genova ~ Italy, <sup>[7]</sup>University of Campania Luigi Vanvitelli, Caserta, Italy ~ Caserta ~ Italy

Aristaless-related homeobox (ARX) is a crucial transcription factor involved in several interneuronopathies, including infantile spasms and West Syndrome. Its polyAlanine motifs are hot spots for elongations, frequently found in kids affected by malignant Epilepsy with limited therapeutic options. Although in the last years several medical therapies have been tested to prevent epilepsy in these patients, an effective treatment is still needed. Noteworthy, the early onset of infantile spasms followed by developmental delay and poor seizure control make these patients at high risk for suddenly unexpected death (SUDEP).

The overall objectives of our project were to study Aristaless-related Homeobox Epilepsy models with the final goal of identifying druggable target molecules. Thus, we have applied for the first time complementary strategies to correct ARX-dependent molecular defects and ameliorate disease evolution. As regards the functional impact of ARX epilepsy mutations, we have previously found a spectrum of molecular damages altering the KDM5C functioning. We have applied SINEB2 long non-coding RNAs (SINEUPs) technology to specifically correct KDM5C protein insufficiency and downstream effectors. By applying this "scalable" RNA-based method, KDM5C-H3K4me3 axis and neuronal morphology were rescued in primary neurons isolated from Arx-disease mouse models. Since KDM5C is a chromatin regulator with a fine-tunable activity during neuronal maturation, we have generated knock-in mouse model RS26Kdm5C/+ to finely modulate Kdm5C expression in Arx disease mice. The impact of KDM5C dosage sensitivity on the brain development remains to be determined. However, no evidence of gross behavioral impairment and structural malformations were observed.

We studied the effect of the FDA-approved histone deacetylase inhibitor suberanilohydroxamic acid (SAHA) in two evolutionary distant ARX disease-models - mouse and *C. elegans* - both defective in conserved functional pathways and neuronal homeostasis. We found that this HDACi drug has an efficacious impact to rescue KDM5C-H3K4me3 axis, abnormal behaviour and neuronal maturation. Furthermore, SAHA exposure of Arx(GCG)7/Y and Arx(KO)Y embryos confirm the role of KDM5C as druggable disease-biomarker. In addition, a rectification of synaptic and ion-channel proteins involved in epileptogenic processes has been observed. Noteworthy, in Arx(GCG)7/Y young animals, i.p. administration of SAHA and bioactive natural small-molecules has shown to ameliorate seizure severity. Although there are still a number of unanswered questions on SAHA applicability as anti-epileptic drug (monotherapy or polytherapy), these results may open a new field of investigation for a drug repositioning process. Collectively, our findings represent a big step forward in molecular targeted drug discovery to treat West syndrome and may also promote pre-clinical studies for neurodevelopmental disorders with associated co-morbidities.

Analisi della funzione del gene Aristaless-related Homeobox nell'Epilessia e identificazione di bersagli molecolari a scopo terapeutico

La sindrome di West associata a espansione da polialanine nel gene Aristaless-related Homeobox (ARX) è una rara e devastante forma di epilessia maligna con spasmi infantili ed ereditarietà X-linked, che si manifesta nel primo mese di vita del bambino.

È caratterizzata da una disorganizzazione generale e caotica di scariche elettriche il cui susseguirsi provoca danni gravi a carico della maturazione del cervello. Generalmente i neonati con questi difetti genetici non rispondono alla terapia antiepilettica convenzionale. Ne deriva un bisogno impellente di sviluppare nuove terapie antiepilettiche che forniscano tempestivamente un rimedio terapeutico prima che si completi lo sviluppo cognitivo.

Obiettivo principale del nostro progetto è stato stabilire le funzioni neuronali controllate dal fattore trascrizionale ARX e dei suoi effettori allo scopo di identificare bersagli molecolari a scopo terapeutico.

Risultati: In questo progetto abbiamo applicato per la prima volta strategie con azione complementare dimostrando la loro efficacia nel correggere, a livello molecolare, sia marcatori epi-genetici che epilettogeni associati ad alterazioni a carico del gene ARX. In particolare abbiamo ottenuto dati interessanti nell'applicazione di: 1. una tecnologia innovativa "RNA-based" che apre a nuove strategie applicative mediante l'impiego di sonde ad acidi nucleici. A partire dai dati ottenuti è ipotizzabile la realizzazione di progetti in collaborazioni con industrie dedicate allo sviluppo di terapie RNA-based per malattie rare "orfane" con fenotipi neurologici simili; 2. un trattamento in vivo con una epi-molecola in due animali-modello "distanti", topo e nematode. Ciò ha consentito di analizzare l'impatto su specifici processi neuronali conservati durante l'evoluzione e di identificare nuovi marcatori-malattia. In particolare mediante l'impiego di questa epi-molecola, abbiamo dimostrato la correzione farmacologica di difetti nel comportamento e dello sviluppo neuronale, sia nei mutanti di nematode per il gene ortologo di ARX e sia in topi con mutazioni da espansioni di polialanine in ARX. Ciò ha permesso di identificare una serie di marcatori- malattia da monitorare durante il processo di epilettogenesi e di evoluzione delle convulsioni. Nell'insieme i dati prodotti rappresentano un grande passo in avanti nella ricerca di base applicata allo studio della Sindrome di West e alla identificazione di terapie innovative per il trattamento delle epilessie farmaco-resistenti. Inoltre, va sottolineato che i risultati ottenuti possono dare grande impulso allo sviluppo di studi pre-clinici per un'ampia classe di patologie genetiche neurologiche con sintomi sovrapponibili.

Poeta et al. Histone demethylase KDM5C is a SAHA-sensitive central hub at the crossroads of transcriptional axes involved in multiple neurodevelopmental disorders. Submitted.

Gustincich et al. The Yin and Yang of nucleic acid-based therapy in the brain. *Prog Neurobiol.* 2017 Aug;155:194-211.

Mattiske et al. Embryonic forebrain transcriptome of mice with polyalanine expansion mutations in the ARX homeobox gene. *Hum Mol Genet.* 2016 25(24):5433-5443.

Benedetti et al. Epigenetic-based therapy: From single- to multi-target approaches. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Dec;69:121-31.

Poeta et al. A regulatory path associated with X-linked intellectual disability and epilepsy links KDM5C to the polyalanine expansions in ARX. *Am J Hum Genet.* 2013;92(1):114-25.

Spasmi infantili; Sindrome di West

Coordinator: Maria Giuseppina Miano  
Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14198

**Disease Name:**

Infantile Spasms (ISSX1); West Syndrome

**Keywords:**

Aristaless-related homeobox (ARX), pharmaco-resistant epilepsy, disease animal models

## Poster P.08.50

### GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS, NOVEL PATHOGENETIC MECHANISMS, AND PILOT CLINICAL STUDIES IN NEONATAL EPILEPSIES ASSOCIATED TO MUTATIONS IN THE KCNQ2/3 POTASSIUM CHANNEL GENES

Miceli F.<sup>[1]</sup>, Soldovieri M.V.<sup>[2]</sup>, Ambrosino P.<sup>[3]</sup>, Lauritano A.<sup>[1]</sup>, Nappi P.<sup>[1]</sup>, Longobardi E.<sup>[1]</sup>, Mosca I.<sup>[2]</sup>, Tagliatela M.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dept. of Neuroscience, University Federico II ~ Naples ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dept. of Medicine, University of Molise ~ Campobasso ~ Italy, <sup>[3]</sup>Dept. of Science and Technology ~ Benevento ~ Italy

Epilepsy affects 0.5-1% of the general population. Among genetic epilepsies, mutations in KCNQ2 and KCNQ3 genes encoding for voltage-dependent K<sup>+</sup> channel subunits cause neonatal epilepsies with wide phenotypic heterogeneity. On the benign end of the spectrum is Benign Familial Neonatal Seizures (BFNS), a rare, autosomal-dominant epilepsy of newborns, characterized by recurrent seizures that begin in the very first days of life and remit after a few weeks or months with mostly display normal interictal EEG, neuroimaging, and psychomotor development. More recently, KCNQ2 mutations have been described in neonates affected with pharmacoresistant seizures with psychomotor retardation, suppression-burst pattern at the EEG, and distinct neuroradiological features, thus defining a so-called "KCNQ2 encephalopathy". The molecular basis for this striking phenotypic heterogeneity is unknown, and no rational therapy exists for the most severe forms. Moreover, the phenotypic spectrum of KCNQ3-related diseases is poorly-defined.

In its original formulation, in the present research project, we proposed: 1. To explore the functional consequences of KCNQ2 mutations associated to neonatal epilepsies to expand the spectrum of molecular mechanisms responsible for disease pathogenesis in each individual/family by state-of-the-art biochemical, electrophysiological, computational, genetic, and in-silico structural modelling; 2. To develop novel animal models of KCNQ2 dysfunction; 3. To test whether treatment with a KCNQ2 opener may improve epileptic phenotype and developmental outcome in children affected with the most severe forms of KCNQ2-related epilepsy (this latter aim was later removed because of retigabine removal from the market).

In the last two years, we have expanded the description of the clinical spectrum of KCNQ2 and KCNQ3-related diseases to include: a. the first case of encephalopathy caused by two KCNQ3 missense mutations (V359L and D542N) in compound heterozygosis (Ambrosino et al., Mol. Neurobiol. 2018); b. specific GoF variants in KCNQ3 causing neurodevelopmental disability, autism spectrum disorders, and abundant sleep-activated spikes (Sands et al., 2019); and c. a proband with a severe phenotype characterized by neonatal-onset pharmacodependent seizures, with developmental delay and intellectual disability carrying a homozygous KCNQ3 loss-of-function variant (Lauritano et al., 2019). In addition, we have started to develop cellular models and tools for a campaign toward the development of novel KCNQ modulators to be used as anticonvulsants (Ostacolo et al., 2019, submitted). Uncovering novel genotype-phenotype correlations in KCNQ2- and KCNQ3-linked channelopathies will have relevant impact on disease-management procedures (i.e. for early genotyping) and on clinical course prediction and treatment, as targeted therapy with KCNQ openers may improve epilepsy and neurodevelopmental outcome in children with KCNQ2/3 encephalopathy.

L'epilessia colpisce lo 0.5-1% della popolazione. Tra le epilessie genetiche vi sono alcune forme fenotipicamente eterogenee associate a mutazioni nei geni KCNQ2 e KCNQ3 che codificano per canali del K<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti. Dal lato benigno dello spettro troviamo le Convulsioni Benigne Familiari Neonatali, autosomico-dominanti, con convulsioni che iniziano nei primi giorni di vita e scompaiono dopo poche settimane, normale EEG intercritico, neuroradiologia, e sviluppo psicomotorio. Più recentemente, mutazioni de novo in KCNQ2 sono anche state descritte in neonati con convulsioni farmacoresistenti, ritardo neurocognitivo, e caratteristiche neuro radiologiche distintive, definendo una "encefalopatia KCNQ2". Le basi molecolari per tale eterogeneità fenotipica sono ignote, e non esistono terapia efficaci per le forme più severe. Inoltre, lo spettro fenotipico associato alle varianti in KCNQ3, più rare, è molto meno chiaro.

Gli obiettivi del presente progetto erano: 1. Esplorare le conseguenze funzionali delle mutazioni in KCNQ2 per espandere lo spettro di meccanismi molecolari responsabili della patogenesi della malattia in ciascun soggetto/famiglia mediante approcci biochimici, elettrofisiologici, computazionali, genetici, e di modelling molecolare in-silico; 2. Sviluppare nuovi modelli animali di disfunzione in KCNQ2; 3. Valutare se il trattamento con attivatori dei canali KCNQ2 possano migliorare il fenotipo epilettico e lo sviluppo neuro cognitivo nei bambini con le forme più severe di encefalopatia KCNQ2. Quest'ultimo obiettivo è stato poi rimosso a causa del ritiro della retigabina dal mercato.

Durante gli ultimi due anni, abbiamo ampliato la descrizione dello spettro fenotipico delle malattie associate a KCNQ2 e KCNQ3, descrivendo; a. il primo caso di encefalopatia causata da due mutazioni missenso in KCNQ3 in eterozigosi composta (Ambrosino et al., Mol. Neurobiol. 2018); b. varianti con guadagno-di-funzione (GoF) in KCNQ3 responsabili di disabilità del neurosviluppo, autismo, e anomalie elettroencefalografiche nel sonno (Sands et al., 2019); e c. un probando con fenotipo grave con convulsioni farmacodipendenti ad insorgenza neonatale e disabilità del neurosviluppo causate da una variante con perdita di funzione in KCNQ3 per la prima volta descritta in omozigosi (Lauritano et al., 2019). Inoltre, abbiamo iniziato lo sviluppo di modelli cellulari utili per una campagna di valutazione di nuovi farmaci modulatori dei canali KCNQ (Ostacolo et al., 2019, submitted). E' possibile anticipare che l'identificazione di nuove correlazioni genotipo-fenotipo nelle canalopatie associate a KCNQ2 e KCNQ3 avrà un impatto notevole sulla gestione diagnostica (ad esempio per la genotipizzazione precoce), sulla prognosi, e l'approccio terapeutico di questi pazienti, dal momento che terapie personalizzate con modulatori dei canali KCNQ potrebbero migliorare le convulsioni e la disabilità neurocognitiva ad esse associate in questi bambini.

Ambrosino P, Freri E, Castellotti B, et al. Kv7.3 Compound Heterozygous Variants in Early Onset Encephalopathy Reveal Additive Contribution of C-Terminal Residues to PIP2-Dependent K<sup>+</sup> Channel Gating. Mol Neurobiol. 2018 Aug;55(8):7009-7024.

Lauritano A, Moutton S, Longobardi E, et al. A novel homozygous KCNQ3 loss-of-function variant causes non-syndromic intellectual disability and neonatal-onset pharmacodependent epilepsy. Epilepsia Open. 2019 Aug 11;4(3):464-475.

Sands TT, Miceli F, Lesca G, et al. Autism and developmental disability caused by KCNQ3 gain-of-function variants. Ann Neurol. 2019 Aug;86(2):181-192

Malattie associate a mutazioni in KCNQ

Coordinator: Maurizio Tagliatela

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GGP15113

**Disease Name:**

KCNQ-related Diseases

**Keywords:**

epilessia, disabilità del neurosviluppo, canali ionici

## Poster P.08.51

### INTERACTION OF PRRT2 WITH SODIUM CHANNELS: PATHOGENETIC BASIS AND NEW TARGETS FOR THE CURE OF PRRT2-ASSOCIATED PAROXYSMAL DISORDERS

Romei A.<sup>[1]</sup>, Sterlini B.<sup>[2]</sup>, Michetti C.<sup>[1]</sup>, Fruscione F.<sup>[3]</sup>, Grasselli G.<sup>[1]</sup>, Valente P.<sup>[2]</sup>, Fassio A.<sup>[2]</sup>, Baldelli P.<sup>[2]</sup>, Maragliano L.<sup>[1]</sup>, Corradi A.<sup>\*[2]</sup>, Benfenati F.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>DIMES, University of Genova ~ Genova ~ Italy, <sup>[3]</sup>DINOGMI, University of Genova ~ Genova ~ Italy

PRRT2 is the single causative gene for pleiotropic paroxysmal syndromes including infantile epilepsy, paroxysmal kinesigenic dyskinesia, ataxia and migraine. The goal of the project is to dissect the contribution of voltage-gated Na-channels (NaV) in PRRT2 pathologies and identify targeted therapies. The objectives are to investigate: (i) the impact of PRRT2-NaV interactions on neuronal excitability in mouse PRRT2KO neurons; (ii) the molecular bases of the specific NaV involvement in PRRT2-linked diseases; (iii) the in vivo contribution of NaV to the PRRT2KO phenotype; (iv) the pathogenic mechanisms underlying the strong cerebellar involvement and (v) the phenotypic rescue with specific NaV-blocking drugs in mouse and human PRRT2KO neurons. We have previously investigated the physiological role of PRRT2 and found that it acts as a neuron-specific network stability gene. The PRRT2KO mouse, which we were first to characterize, mimics the human pathology and displays central network hyperexcitability. In addition to increased synaptic facilitation, the major contribution to the increased excitability was due to an increased Na<sup>+</sup> current density in PRRT2KO mice and iPSC-derived human neurons. We also demonstrated that PRRT2 specifically modulates trafficking and biophysics of NaV1.2/1.6. Together with the exquisite sensitivity of PRRT2 symptoms to NaV-blockers, this suggests that PRRT2 disorders can be considered largely channelopathies. The modulation of NaV1.2/1.6 currents by PRRT2 will be studied in cell lines, constitutive/conditional PRRT2 KO mice and human neurons using cellular, molecular, computational and advanced physiological approaches. The demonstration of a specific modulation of NaV by PRRT2 provides a mechanistic basis for the pathogenesis of PRRT2 paroxysmal disorders and allows identifying targeted and effective therapies.

Interazioni di PRRT2 con i canali sodio: basi patogenetiche e nuovi bersagli terapeutici per le malattie parossistiche associate a mutazioni nel gene PRRT2

Disturbi parossistici come epilessia infantile benigna (BFIE), discinesia chinesigenica (PKD), convulsioni infantili e coreoatetosi (ICCA) ed emicrania emiplegica (HM), sono associati a mutazioni nel gene che codifica per la proteina PRoline-Rich 2 (PRRT2), una proteina specifica dei neuroni completamente sconosciuta fino a pochi anni fa. Il PRRT2 rappresenta quindi un gene malattia che vale la pena indagare per chiarire la patogenesi delle diverse forme parossistiche, tracciare le relazioni tra genotipo-fenotipo e sviluppare nuove terapie mirate. Abbiamo dimostrato che la proteina è associata alle membrane neuronali dell'assone e dei terminali sinaptici e la sua carenza altera i processi di plasticità sinaptica a breve termine e aumenta l'eccitabilità neuronale provocando un aumento dei canali sodio voltaggio-dipendenti esposti sulla membrana. Il progetto si propone di analizzare le basi molecolari delle interazioni tra PRRT2 e canali sodio, il loro contributo alle manifestazioni parossistiche e l'efficacia di nuovi farmaci selettivi per sottotipi di canali sodio nella cura di queste forme patologiche. Il progetto avrà un impatto futuro sui pazienti perché: (i) la

caratterizzazione dei meccanismi patogenetici delle malattie da PRRT2 aprirà un nuovo campo per ottimizzare il loro trattamento, impiegando specifici bloccanti dei canali con minori effetti collaterali; (ii) lo studio del forte contributo cerebellare ai parossismi contribuirà a chiarire meglio la variabilità clinica delle malattie da PRRT2 e identificare terapie efficaci; (iii) lo studio del fenotipo nei neuroni dei pazienti consentirà migliori correlazioni genotipo-fenotipo ed efficaci trattamenti personalizzati.

1. Valente P, Romei A, Fadda M, Sterlini B, Lonardoni D, Forte N, Fruscione F, Castroflorio E, Michetti C, Giansante G, Valtorta F, Tsai JW, Zara F, Nieuws T, Corradi A, Fassio A, Baldelli P, Benfenati F (2019). Constitutive inactivation of the PRRT2 gene alters short-term synaptic plasticity and promotes network hyperexcitability in hippocampal neurons. *Cereb Cortex* 29: 2010-2033. doi: 10.1093/cercor/bhy079.
2. Fruscione F, Valente P, Sterlini B, Romei A, Baldassari S, Fadda M, Prestigio C, Giansante G, Sartorelli J, Rossi P, Rubio A, Gambardella A, Nieuws T, Broccoli V, Fassio A, Baldelli P, Corradi A, Zara F, Benfenati F (2018). PRRT2 controls neuronal excitability by negatively modulating Na<sup>+</sup> channel 1.2/1.6 activity. *Brain* 141: 1000-1016. doi: 10.1093/brain/awy051.
3. Michetti C, Corradi A, Benfenati F (2017). PRRT2, a network stability gene. *Oncotarget* 8: 55770-55771. doi: 10.18632/oncotarget.19506.
4. Michetti C, Castroflorio E, Marchionni I, Forte N, Sterlini B, Binda F, Fruscione F, Baldelli P, Valtorta F, Zara F, Corradi A, Benfenati F (2017). The PRRT2 knockout mouse recapitulates the neurological diseases associated with PRRT2 mutations. *Neurobiol Dis* 99: 66-83. doi: 10.1016/j.nbd.2016.12.018.
5. Valtorta F, Benfenati F, Zara F, Meldolesi J (2016). PRRT2: from paroxysmal disorders to regulation of synaptic function. *Trends Neurosci* 39: 668-679. doi: 10.1016/j.tins.2016.08.005.
6. Valente P, Castroflorio E, Rossi P, Fadda M, Sterlini B, Cervigni RI, Prestigio C, Giovedì S, Onofri F, Mura E, Guarnieri FC, Marte A, Orlando M, Zara F, Fassio A, Valtorta F, Baldelli P, Corradi A, Benfenati F (2016). PRRT2 is a key component of the Ca<sup>2+</sup>-dependent neurotransmitter release machinery. *Cell Rep* 15: 117-131. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.005.
7. Rossi P, Sterlini B, Castroflorio E, Marte A, Onofri F, Valtorta F, Maragliano L, Corradi A, Benfenati F (2016). A novel topology of proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2): hints for an intracellular function at the synapse. *J Biol Chem* 291: 6111-6123. doi: 10.1074/jbc.M115.683888.

Discinesia parossistica kinesigenica

Coordinator: Fabio Benfenati

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**



GGP19120

**Disease Name:**

Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia

**Keywords:**

paroxysmal disorders, paroxysmal kinesigenic dyskinesia, sodium channels

## **09\_Genetic neurological disorder\Intellectual Disabilities**

## Poster P.09.52

### NLG3 SHAPES EXCITATION/INHIBITION RATIO IN NEURONAL CIRCUITS OF ASD MURINE MODELS: IMPLICATIONS OF THE CA2 HIPPOCAMPAL CIRCUIT IN SOCIAL DEFICITS

Griguoli M.<sup>[1]</sup>, Petrini E.<sup>[2]</sup>, Modi B.<sup>[1]</sup>, Pimpinella D.<sup>[1]</sup>, Pazienti A.<sup>[1]</sup>, Barberis A.<sup>\*[2]</sup>, Cherubini E.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>EBRI ~ Rome ~ Italy, <sup>[2]</sup>Italian Institute of Technology ~ Genova ~ Italy

Autism Spectrum Disorders (ASDs) comprise a heterogeneous group of neuro-developmental abnormalities with strong genetic component, characterized by impaired social interactions and stereotyped behaviors. A subset of ASDs is associated with alterations of genes involved in synaptic function. Among these are mutations/deletions of genes encoding for neuroligins (NLGs), postsynaptic adhesion molecules that interact with the presynaptic partners neurexins to bridge the pre and postsynaptic elements. Here we study the role of synaptic dysfunctions in NLG3 KO and NLG3R451C KI mice, two animal models of autism exhibiting deficits in social behavior reminiscent of those found in ASDs. First, *in vivo* recordings from NLG3 KO anesthetized animals revealed a selective impairment of spike related slow wave activity in the CA2, a hippocampal area which has emerged as a central structure for social memory processing. In addition, theta and gamma frequencies in both CA2 and CA3 hippocampal regions were reduced. These network effects were associated with increased neuronal excitability of CA2 hippocampal area. *Ex vivo* recordings from CA2 principal cells unveiled an imbalance of excitation and inhibition in this area accompanied by the reduction of perisomatic inhibition mediated by CCK GABAergic interneurons. Second, we studied the excitatory and inhibitory synaptic function in cultures from NL3R451C KI mice following the delivery of a chemical plasticity-inducing protocol known to induce potentiation of inhibitory synapses (iLTP). iLTP induction in wild-type (WT) neurons determined the increase of gephyrin along with the accumulation and immobilization of GABAAR at synapses. In addition, the iLTP expression led to the immobilization of NL3 at GABAergic synapses. On the contrary, in neurons from NL3R451C KI mice, the synaptic abundance of gephyrin and GABAARs were indistinguishable from control neurons. In line with this, in KI neurons the higher lateral diffusion of GABAAR and NL3R451C at inhibitory synapses observed in basal conditions persisted after the chemical stimulation. In a parallel set of data, we found that the chemical protocol induced depression of excitatory synapses (LTD) in WT but not in NL3R451C KI neurons. Overall, these data indicate that NLG3 is an important “molecular hub” for the regulation of the excitation-to-inhibition ratio that may contribute for the deficits in social memory reminiscent of those observed in autistic patients.

La neuroligina 3 controlla l'equilibrio tra eccitazione e inibizione nei circuiti neuronali: coinvolgimento della regione ippocampale CA2 nei deficit sociali osservati in modelli murini di disordini dello spettro autistico.

I disordini dello spettro autistico (ASD) comprendono una serie di anomalie del neurosviluppo con una forte componente genetica i cui sintomi includono alterazioni nelle interazioni sociali e comportamenti stereotipati. Un sottogruppo ASD è caratterizzato da alterazioni a carico di geni che codificano per le proteine sinaptiche. In particolare, sono state osservate mutazioni o delezioni nei geni delle proteine postsinaptiche neuroligine (NLG), che interagendo con le proteine presinaptiche neurexine fanno da ponte tra l'elemento presinaptico e quello postsinaptico. In questo studio sono stati analizzati due modelli murini di ASD che non hanno la NLG3 (NLG3KO) o hanno una forma mutata della stessa

(NLG3KI) e che presentano alterazioni nel comportamento sociale simili a quelli osservati nei pazienti affetti da ASD.

Registrazioni elettrofisiologiche da una regione dell'ippocampo coinvolta nella formazione della memoria sociale, ovvero la capacità di riconoscere un individuo familiare, hanno evidenziato delle alterazioni dell'attività neuronale e difetti nella trasmissione sinaptica eccitatoria e inibitoria nei topi NLG3KO, che potrebbero essere responsabili delle alterazioni nel loro comportamento sociale. Inoltre lo studio dettagliato dell'attività sinaptica nei topi NLG3KI ha evidenziato alterazioni nel movimento dei recettori all'interno delle sinapsi inibitorie e un'alterata plasticità a livello delle sinapsi eccitatorie. La mancanza della NLG3 o la presenza di una sua forma mutata può quindi alterare l'equilibrio tra eccitazione e inibizione, fondamentale per il corretto funzionamento dei circuiti neuronali che sono alla base delle funzioni cognitive complesse. Queste evidenze aiuteranno a trovare nuovi target molecolari per interventi terapeutici, che mirino a ripristinare il corretto equilibrio tra inibizione ed eccitazione nei circuiti neuronali in ASD.

Hitti FL, Siegelbaum SA (2014) The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508:88-92.

Modi B et al. (2019) Possible Implication of the CA2 Hippocampal Circuit in Social Cognition Deficits Observed in the Neuroligin 3 Knock-Out Mouse, a Non-Syndromic Animal Model of Autism. *Front Psychiatry*. 2019 Jul 19;10:513. doi: 10.3389/fpsyt.2019.00513. eCollection 2019.

Radyushkin K et al. (2009) Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav* 8:416-425.

Stevenson EL, Caldwell HK (2014) Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *Eur J Neurosci* 40:3294-3301.

Sudhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455:903-911.

Zoghbi HY, Bear MF (2012) Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(3). pii: a009886. doi: 10.1101/cshperspect.a009886.

Disordini dello spettro autistico

Coordinator: Enrico Cherubini

Partner: Andrea Barberis

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16083

**Disease Name:**

Autism Spectrum Disorders

**Keywords:**

CA2 hippocampal region, GABAA receptor lateral diffusion, iLTP

## Poster P.09.53

### ROLE OF INTRACELLULAR CHLORIDE ACCUMULATION IN DOWN SYNDROME PHYSIOPATHOLOGY IN MICE

#### RUOLO DELLA ACCUMULAZIONE DI CLORO INTRACELLULARE NELLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DI DOWN.

Savardi A.<sup>[1]</sup>, Alberti M.<sup>[1]</sup>, Ziogas I.<sup>[1]</sup>, Bolla M.<sup>[1]</sup>, Parrini M.<sup>[1]</sup>, Narducci R.<sup>[1]</sup>, Colombi I.<sup>[1]</sup>, Portioli C.<sup>[1]</sup>, Ronzitti G.<sup>[2]</sup>, Mingozi F.<sup>[2]</sup>, Borgogno M.<sup>[3]</sup>, La Sala G.<sup>[3]</sup>, Ortega Martínez J.A.<sup>[3]</sup>, De Vivo M.<sup>[3]</sup>, Contestabile A.<sup>[1]</sup>, Cancedda L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Brain Development and Disease Laboratory ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Genethon ~ Evry ~ France, <sup>[3]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Molecular Modeling & Drug Discovery Laboratory ~ Genova ~ Italy

The Ts65Dn mouse model of Down (DS) reproduces the disabilities of the human syndrome and it presents learning and memory deficits, synaptic dysfunctions, brain development alterations and increased susceptibility to seizures. Increased expression of the chloride importer NKCC1 in adult Ts65Dn mice, leads to an imbalance of excitation and inhibition in the brain. Interestingly, cognitive functions as well as synaptic plasticity are restored by treatment with the NKCC1 inhibitor (and FDA-approved diuretic) bumetanide.

However, bumetanide's effect on cognition and synaptic plasticity in Ts65Dn mice may be also mediated by targets other than NKCC1. Thus, we developed a knock-down approach to normalize NKCC1 expression in trisomic animals. NKCC1 specific down-regulation by RNA interference restored GABAAR-mediated inhibition and rescued behavioral performance in learning and memory tests in adult DS mice.

In parallel, we investigated the molecular mechanisms responsible for NKCC1 upregulation in Ts65Dn mice. We found that NKCC1 upregulation in trisomic neurons does not derive from higher mRNA transcription or decreased protein turnover. NKCC1 upregulation in trisomic neurons derives from a diminished translational repression exerted on the 3' untranslated region (3'UTR) of the gene. This region is site of action of diverse microRNAs (miRs). By applying a combination of bioinformatic prediction tools and gene-expression screening, we identified diverse miR candidates able to interact with NKCC1 3'UTR and repress NKCC1 expression. Upregulation of these same miRs normalizes NKCC1 levels and intracellular chloride concentration in trisomic neurons.

As NKCC1 plays a major role in physiological brain development, we also assessed possible long-term effects of an early treatment with bumetanide or NKCC1 downregulation during postnatal development on learning and memory deficits in Ts65Dn mice. We found that both approaches rescued cognitive deficits and increased susceptibility to seizures in adult Ts65Dn mice.

Finally, since chronic bumetanide treatment is burdened by diuretic side effects caused by the antagonization of the kidney importer isoform NKCC2, we also synthesized and tested a new compound with high NKCC1 specificity. We found that our new drug candidate is able to restore aberrant intracellular chloride concentration in DS neurons in vitro, and to recover the cognitive deficits in adult Ts65Dn mice, without diuretic effect or over toxicity upon chronic treatment.

Altogether, our findings indicate that targeting aberrant Cl homeostasis in Down syndrome may be a valuable tool to design innovative therapeutic approaches.

Il modello murino della sindrome di Down (SD) Ts65Dn riproduce le principali disfunzioni della patologia umana presentando alterazioni di apprendimento e memoria, alterazioni dello sviluppo cerebrale ed aumentata suscettibilità a crisi epilettiche. Precedentemente abbiamo riscontrato che in topi Ts65Dn adulti vi è un aumento di espressione di NKCC1, un trasportatore di cloro espresso nel cervello, che determina un sbilanciamento tra eccitazione ed inibizione. Inoltre, abbiamo osservato che il trattamento con bumetanide, un diuretico inibitore di NKCC1, determina un ripristino delle funzioni cognitive nei topi Ts65Dn. Tuttavia, l'effetto di bumetanide potrebbe essere mediato dall'attività del farmaco anche su altri target, in quanto la diretta attività in vivo su NKCC1 non è stata dimostrata. Per verificare ciò, abbiamo sviluppato un approccio di riduzione dell'espressione di NKCC1 dimostrando che la specifica riduzione di NKCC1 determina un recupero dell'alterata eccitabilità cerebrale e delle prestazioni cognitive dei topi Ts65Dn adulti, indicando NKCC1 come target efficace per la SD. In parallelo, abbiamo investigato il meccanismo molecolare responsabile dell'aumento di espressione di NKCC1 in topi Ts65Dn. Abbiamo trovato che l'aumento di NKCC1 in neuroni trisomici deriva da una diminuita repressione della trasduzione di NKCC1 che avviene in una regione del gene chiamata 3'UTR ad opera di microRNA. Abbiamo identificato diversi microRNA candidati che potrebbero interagire con la regione UTR di NKCC1 e reprimerne l'espressione. L'aumento di espressione di questi microRNA risulta in una riduzione di NKCC1 e della concentrazione di cloro in neuroni trisomici, confermando la nostra ipotesi.

Inoltre, visto che NKCC1 gioca un ruolo fondamentale nel fisiologico sviluppo del cervello, abbiamo investigato l'effetto a lungo termine del trattamento di bumetanide o della riduzione di NKCC1 effettuati durante il primo periodo postnatale nei topi Ts65Dn. Abbiamo osservato che entrambi gli approcci determinano un recupero dei deficit cognitivi e della suscettibilità alle crisi epilettiche nei topi adulti, indicando che il trattamento durante lo sviluppo determina un effetto che persiste nell'adulto. Infine, visto che il trattamento cronico con bumetanide causa un effetto avverso rappresentato dall'eccessiva diuresi, dovuto alla sua attività sul trasportatore NKCC2 espresso a livello renale, abbiamo sintetizzato un nuovo composto chimico con un'alta specificità per NKCC1. Abbiamo dimostrato che il nuovo composto è in grado di determinare un recupero dell'alterata concentrazione di cloro nei neuroni trisomici e dei deficit cognitivi nei topi Ts65Dn, senza presentare alcun effetto diuretico o tossico dopo trattamento cronico.

In conclusione, i nostri risultati indicano che nella SD un'azione diretta al ripristino dell'alterata omeotasi del cloro neuronale possa rappresentare una preziosa strategia terapeutica per la creazione di terapie specifiche e innovative.

S. Naskar et al. "The development of synaptic transmission is time-locked to early social behaviors in rats". *Nat Commun.* 2019

J.Szczurkowska et al. "NEGR1 and FGFR2 cooperatively regulate cortical development and core behaviours related to autism disorders in mice". *Brain.* 2018

A.W. Cwetsch et al. "In vivo methods for acute modulation of gene expression in the central nervous system". *Prog Neurobiol.* 2018

S. Sulis Sato et al. "Simultaneous two-photon imaging of intracellular chloride concentration and pH in mouse pyramidal neurons in vivo". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017

A.Contestabile et al. "The GABAergic Hypothesis for Cognitive Disabilities in Down Syndrome". *Front Cell Neurosci.* 2017

Sindrome di Down

Coordinator: Laura Cancedda  
Duration (N. Years): 5  
Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TCP15021

**Disease Name:**

Down Syndrome

**Keywords:**

Down Syndrome, Chloride accumulation, NKCC1

## Poster P.09.54

### NEUROTROPHIC-MIMETIC STRATEGY TO RESCUE SYNAPTIC PLASTICITY AND COGNITIVE FUNCTIONS IN A MOUSE MODEL OF DOWN SYNDROME

Parrini M.<sup>[1]</sup>, Alberti M.<sup>[1]</sup>, Colombi I.<sup>[1]</sup>, Ghezzi D.<sup>[2]</sup>, Deidda G.<sup>[1]</sup>, Cancedda L.<sup>[1]</sup>, Contestabile A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Neuroscience and Brain Technologies, Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Medtronic Chair in Neuroengineering, EPFL ~ Lausanne ~ Switzerland

Down syndrome (DS) is caused by the triplication of human chromosome 21, and it is the most frequent genetic cause of mental retardation. Although numerous studies have shown that cognitive impairment possibly arises from dysfunction of the hippocampal circuit, there is little insight into neurobiological bases of these abnormalities, and thus, there has been little progress in defining effective treatments. The trisomic Ts65Dn mouse model of DS reproduces the essential cognitive disabilities of the human syndrome. Previous studies have shown that impaired synaptic plasticity of mature hippocampal neurons and decreased hippocampal adult neurogenesis are main determinants in reducing cognitive functions in DS animal models. Currently, most preclinical therapeutic approaches in the DS mouse models have focused on rescuing either one or the other of these impairments. Interestingly, we have found that the expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is decreased in the brains of DS patients. On the other hand, BDNF signaling modulates both synaptic plasticity, and adult neurogenesis. Therefore, we propose to promote BDNF/TrkB signaling using a BDNF-mimetic drug with the twofold aim of rescuing synaptic plasticity and increase adult neurogenesis toward the rescue of cognitive functions in a mouse model of DS. Our results indicate that indeed promoting BDNF/TrkB signaling with the BDNF-mimetic drug 7,8-Dihydroxyflavone (DHF) rescued hippocampal synaptic plasticity, increased dentate adult neurogenesis and restored cognitive performances in different behavioral tasks in Ts65Dn mice. However, our results also show that DHF activation of TrkB signaling pathway is distinct from the one exerted by endogenous BDNF. The long-term assessment of DHF usefulness in trisomic mice are currently under investigation. Overall, our experiments show in a reliable animal model of DS the efficacy of a novel and multifaceted therapeutic approach with good potential to be translated into clinical practice.

La sindrome di Down (DS) è causata dalla triplicazione del cromosoma umano 21, ed è la più frequente causa genetica di ritardo mentale. Anche se numerosi studi hanno dimostrato che il deterioramento cognitivo associato alla sindrome deriva principalmente dalla disfunzione del circuito ippocampale, ancora non si conoscono a sufficienza le basi neurobiologiche di queste anomalie e pertanto, pochi progressi sono stati ottenuti nel definire trattamenti farmacologici efficaci. Il modello murino trisomico Ts65Dn riproduce le principali disabilità cognitive della sindrome umana. Studi precedenti hanno dimostrato che l'alterata plasticità sinaptica dei circuiti neuronali e la diminuita neurogenesi adulta dell'ippocampo sono tra le cause principali dei deficit cognitivi in modelli animali di DS. Attualmente, la maggior parte degli approcci terapeutici preclinici che sono stati testati in modelli di DS sono incentrati sul recupero di uno o l'altro di questi aspetti. I nostri dati indicano che l'espressione del Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) è ridotta nel cervello dei pazienti con DS. D'altra parte, la via di segnalazione del BDNF è nota modulare sia la plasticità sinaptica sia la neurogenesi adulta. Pertanto, proponiamo di stimolare questa via di segnalazione attraverso l'uso di un farmaco BDNF-mimetico con il duplice obiettivo di promuovere la plasticità sinaptica e aumentare la neurogenesi adulta allo scopo di recuperare i deficit cognitivi del modello murino Ts65Dn. I nostri



dati indicano che effettivamente, la stimolazione della via di questa via di segnalazione con il BDNF-mimetico 7,8-Dihydroxyflavone (DHF) è in grado di recuperare la plasticità sinaptica, la neurogenesi ippocampale e i deficit cognitivi in diversi test comportamentali nei topi trisomici. Tuttavia i nostri risultati mostrano anche che l'attivazione del recettore per il BDNF è diversa da quella esercitata dal BDNF endogeno. Attualmente stiamo anche valutando l'effetto del trattamento a lungo termine con il DHF sugli animali trisomici. Nel complesso, i nostri esperimenti mostrano, in un modello animale di DS, l'efficacia di un nuovo approccio terapeutico con un buon potenziale per essere tradotto in pratica clinica.

1. Parrini M, Ghezzi D, Deidda G, Medrihan L, Castroflorio E, Alberti M, Baldelli P, Cancedda L, Contestabile A\*.  
Aerobic exercise and a BDNF-mimetic therapy rescue learning and memory in a mouse model of Down syndrome. *Scientific Reports*. 2017; 7, 16825.
2. Contestabile A\*, Magara S, Cancedda L.  
The GABAergic hypothesis for cognitive disabilities in Down syndrome. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017; 11, 54.
3. Valenti D, de Bari L, De Rasmio D, Signorile A, Henrion-Caude A, Contestabile A, Vacca R.A.  
The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1862, 1093-1104.
4. Deidda G, Parrini M, Naskar S, Fernandez Bozarth I, Contestabile A\*, Cancedda L\*.  
Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome.  
*Nature Medicine*. 2015; 21, 318-26.
5. Contestabile A\*, Greco B, Ghezzi D, Tucci V, Benfenati F, Gasparini L.  
Lithium rescues synaptic plasticity and memory in Down syndrome mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123, 348-61.

Sindrome di Down

Coordinator: Andrea Contestabile

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15043

**Disease Name:**

Down Syndrome

**Keywords:**

Down syndrome, Neurotrophins, cognitive disabilities

## Poster P.09.55

### **DROSOPHILA MELANOGASTER AS A MODEL TO STUDY THE ROLE OF FMRP PROTEIN, INVOLVED IN THE FRAGILE-X SYNDROME, IN THE PI-RNA-MEDIATED GENOME STABILITY**

Specchia V.<sup>[1]</sup>, D'Attis S.<sup>[1]</sup>, Puricella A.<sup>[1]</sup>, Cattenoz P.<sup>[2]</sup>, Giangrande A.<sup>[2]</sup>, Bozzetti M.G.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>DiSteBA - University of Salento ~ Lecce ~ Italy, <sup>[2]</sup>IGBMC - Illkirch ~ Strasbourg ~ France

Fragile-X Syndrome represents the most common form of hereditary mental retardation. The disorder originates with mutations in the Fmr1 gene coding for the FMRP protein, which, with its paralogs FXR1 and FXR2, constitute a well-conserved family of RNA-binding proteins. The dFmr1 gene is the Drosophila ortholog of the human gene (Fmr1) involved in the syndrome (1). Drosophila melanogaster is considered a good model for the study of the molecular mechanisms at the bases of the different phenotypes exhibited by patients. Drosophila has a unique fragile X-related gene, the dFmr1 gene, whose mutants exhibit defects in neuronal structure and function, behavior, as well as germline development, resembling those observed in patients (2,3). During the first part of the project, we identified and validated a new role for the dFmr1 gene in the silencing of transposable elements and repetitive sequences mediated by the piRNA pathway in the gonads (2,4-6). The starting point was the observation that the crystal-Stellate interaction (2), depending on the correct function of the piRNA pathway, was deregulated in dFmr1 mutants. We also demonstrated that dFmr1 interacts genetically and co-localizes with Aubergine and Vasa, two key components of the pathway. We thoroughly investigated the genetic and physical interaction of dFmr1 in the gonads, looking at the rescue of the "crystal phenotype" in testes and at the fertility of dFmr1 mutants in a genetic background overexpressing genes with a role in the piRNA pathway. These results will be useful for clarifying the role of dFmr1 in the gonads as well as in the nervous system (6-8). During the last part of the project we analyzed the possible role of the piRNA pathway in the nervous system, gaining information on its presence in this tissue and on the function of dFmr1 in the pathway. In addition, we started studying a possible physiological role of transposable elements during brain development. Our research will define whether the phenotypes exhibited by dFmr1 mutants due to genome instability share a common molecular pathway.

La Drosophila melanogaster come modello per lo studio del ruolo della proteina FMRP, coinvolta nella sindrome della X-fragile, nella stabilità genomica mediata dai piRNA.

La sindrome della X-fragile rappresenta la forma più comune di ritardo mentale ereditario. Il disturbo è dovuto a mutazioni nel gene Fmr1 che codifica per la proteina FMRP, che, con i suoi paraloghi FXR1 e FXR2, costituisce, nell'Uomo, una famiglia ben conservata di proteine che legano l'RNA. Il gene dFmr1 in Drosophila è l'ortologo del gene umano (Fmr1) coinvolto nella sindrome (1). Drosophila melanogaster è considerato un buon modello per lo studio del meccanismo molecolare alla base dei diversi fenotipi esibiti dai pazienti con la sindrome. La Drosophila possiede un singolo gene, collegato a quello responsabile della sindrome, il gene dFmr1. I mutanti di questo gene presentano difetti nella struttura neuronale e nella funzione, nel comportamento e nello sviluppo delle gonadi, simili a quelli osservati nei pazienti (2,3). Durante la prima parte del progetto, abbiamo identificato un nuovo ruolo per il gene dFmr1 in un processo cellulare che regola elementi genetici mobili e sequenze ripetute assicurando la stabilità del genoma. Questo processo si chiama "piRNA pathway" ed è mediato dai

piRNA che sono piccoli RNA che “silenziano” gli elementi mobili del genoma (2,4-6). Il nostro punto di partenza è stata l'osservazione che l'interazione tra crystal e Stellate, che dipende da un corretto funzionamento del piRNA pathway, è deregolata in mutanti dFmr1 e questo causa la presenza di aggregati cristallini nei testicoli di moscerini mutanti e questo è un fenotipo molto semplice da seguire (2). Abbiamo anche dimostrato che dFmr1 interagisce geneticamente e co-localizza con proteine che fanno parte del piRNA pathway, in particolare Aubergine e Vasa. Studiare le interazioni genetiche sarà utile per chiarire il ruolo di dFmr1 nel pathway di silenziamento genico degli elementi trasponibili e delle sequenze ripetute, nelle gonadi e nel sistema nervoso (6-8), in quanto, durante l'ultima parte del progetto abbiamo analizzato il possibile ruolo del piRNA pathway nel sistema nervoso, ottenendo informazioni sulla sua presenza anche in questo tessuto e sulla funzione di dFmr1 nel pathway. Inoltre, abbiamo iniziato a studiare un possibile ruolo fisiologico degli elementi trasponibili durante lo sviluppo del cervello. La nostra ricerca intende chiarire, usando Drosophila come modello per lo studio della sindrome X-fragile, se nella maggior parte dei fenotipi esibiti dai mutanti dFmr1 e causati dall'instabilità del genoma sia presente una base molecolare comune.

1. Jin and Warren, Hum Mol Genet (2000) 9, 901-8
2. Bozzetti, Specchia et al., J Cell Sci (2015) 128, 2070-84
3. Zhang et al., Cell (2001) 107, 591-03
4. Bozzetti et al., IJMS (2017) 18, 1066
5. Specchia et al., Front. Genet. (2019) 10:10
6. Cook et al., Cell, (2004) 116, 817–829
7. Specchia et al., Nature (2010) 463, 662-665
8. Zhou et al., Mol Cell (2008) 32, 592-599

Sindrome della X-fragile

Coordinator: Maria Giuseppina Bozzetti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14181

**Disease Name:**

Fragile-X Syndrome

**Keywords:**

Fragile-X syndrome, Drosophila melanogaster, Transposable elements

## Poster P.09.56

### SETD5 REGULATES CHROMATIN METHYLATION STATE AND PRESERVES GLOBAL TRANSCRIPTIONAL FIDELITY DURING BRAIN DEVELOPMENT AND NEURONAL WIRING

**Sessa A.**<sup>[1]</sup>, Fagnocchi L.<sup>[2]</sup>, Mastrototaro G.<sup>[1]</sup>, Massimino L.<sup>[1]</sup>, Mattia Z.<sup>[1]</sup>, Indrigo M.<sup>[1]</sup>, Cattaneo S.<sup>[1]</sup>, Martini D.<sup>[3]</sup>, Gabellini C.<sup>[3]</sup>, Pucci C.<sup>[3]</sup>, Fasciani A.<sup>[2]</sup>, Belli R.<sup>[2]</sup>, Taverna S.<sup>[1]</sup>, Andreazzoli M.<sup>[3]</sup>, Alessio Z.<sup>[2]</sup>, Broccoli V.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Trento ~ Trento ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università di Pisa ~ Pisa ~ Italy

Mutations in one SETD5 allele are genetic causes of intellectual disability and autistic spectrum disorders. However, the mechanisms by which SETD5 regulates brain development and function remain largely elusive. Herein, we found that Setd5 haploinsufficiency impairs proliferative dynamics of neural progenitors and synaptic wiring of neurons, ultimately resulting in behavioral deficits in mice. Mechanistically, Setd5 inactivation in neural stem cells, zebrafish and mice equally affects genome-wide levels of H3K36me3 on active gene bodies. Notably, we demonstrated that SETD5 directly deposits H3K36me3, which is essential to allow on-time RNA elongation dynamics. Hence, Setd5 gene loss leads to abnormal transcription with impaired RNA maturation causing detrimental effects on gene integrity and splicing. Altogether, these findings identify SETD5 as a fundamental epigenetic enzyme controlling the transcriptional landscape in neural progenitors and their derivatives and illuminate the molecular events which connect epigenetic defects with neuronal dysfunctions at the basis of related human diseases.

SETD5 regola la metilazione della cromatina e preserva la fedeltà trascrizionale durante lo sviluppo cerebrale e il funzionamento neuronale

Mutazioni nel gene SETD5 sono tra le cause genetiche di disabilità intellettive e alcuni casi di disordini dello spettro autistico. Comunque i meccanismi per cui SETD5 regola lo sviluppo la funzionalità del cervello rimangono largamente oscuri. Noi abbiamo scoperto che diminuzione nei livelli di SETD5 causa sia dei problemi alle cellule staminali neuronali durante la vita embrionale che problemi nella funzione delle cellule neurali adulte, neuroni in particolare. Questo perché SETD5 agisce come una sorta di architetto molecolare che aiuta l'organizzazione del trasferimento dell'informazione dal nostro patrimonio genetico alle proteine che, materialmente sono gli attori molecolari delle nostre cellule. Quando SETD5 manca queste informazioni vengono veicolate in maniera alterata e incompleta con importanti deficit funzionali nella cellula, in particolare quelle neurali. Come conseguenza i topi privi del gene Setd5 mostrano comportamenti anomali sia dal punto di vista cognitivo che sociale.

Sessa et al., Neuron, 2019

Disabilità intellettiva, disordini dello spettro autistico

Coordinator: Alessandro Sessa

Partners: Alessio Zippo, Massimiliano Andreazzoli

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15096

**Disease Name:**

Intellectual Disability, Autism Spectrum Disorders

**Keywords:**

Brain development, Epigenetics, Neurodevelopmental disorders

## Poster P.09.57

### **INTRACELLULAR CHLORIDE DYNAMICS IN AUTISTIC BRAIN: A BETTER UNDERSTANDING IS NEEDED FOR TAILORED CURES.**

Lodovichi C.<sup>[1]</sup>, Lamers D.<sup>[2]</sup>, Maset A.<sup>[1]</sup>, Ratto G.M.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto di Neuroscienze del CNR ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Nanoscienze CNR e Scuola Normale Superiore ~ Pisa ~ Italy

Neuronal activity is finely tuned during sleep, wakefulness and cognitive and sensory tasks by the balancing act of principal neurons and interneurons. This is particularly relevant in pathological conditions since it is gradually emerging that a distortion of the dialogue between excitatory and inhibitory neurons is likely to be at the basis of most, if not all, cognitive deficits. Inhibition shapes the activity of principal neurons playing a crucial role in sensory cognition and learning. Fast GABA transmission relies on the activity of channel mainly permeable to chloride and neuronal inhibition requires the influx of Cl<sup>-</sup> that hyperpolarizes the target neuron. A central tenet of our understanding of synaptic inhibition is that GABAergic activity always results in chloride influx, except in the early phases of development when intracellular chloride is high and GABA depolarizes the postsynaptic neurons.

This picture is challenged by some recent work of us that, by exploiting a novel technique that allows to measure intracellular chloride by means of two photon imaging, demonstrate that chloride regulation in pyramidal neurons of adult mice is far more dynamic than expected. Indeed, our preliminary data show that in the mouse cortex Cl<sup>-</sup> follows a day/night regulation where chloride attains low levels during the day (the resting period for mice) but rises dramatically at the peak of their activity period. This variation is accompanied by changes in the dynamic range of inhibition and on cortical synchronization. In this project we will explore the role of this hitherto unsuspected dynamic of inhibitory transmission in monogenic models of cognitive deficits and autism by means of in vivo and ex vivo physiology and imaging with the intent of providing a sound rationale to the idea of targeting chloride regulation for the treatment of brain disorders

Dinamica della concentrazione del cloro intracellulare in modelli di deficit cognitivi

L'attività neuronale è controllata durante la veglia, il sonno e durante qualsiasi compito cognitivo, da un delicato equilibrio tra neuroni eccitatori ed inibitori. Questo equilibrio è particolarmente importante in condizioni patologiche, ed infatti stiamo gradualmente capendo che difetti di questo equilibrio sono alla base di molti se non tutti, i deficit cognitivi. L'attività sinaptica inibitoria modella nel tempo il pattern di attività dei neuroni principali e questo dialogo tra eccitazione ed inibizione è fondamentale per la corretta computazione cerebrale, per le funzioni sensoriali e per produrre le risposte comportamentali. Il meccanismo biofisico alla base della inibizione è dato dal legame del principale neurotrasmettitore inibitorio, il GABA, con dei recettori posti sulle membrane post sinaptiche. Il legame del GABA con questi recettori determina l'apertura di pori sulla membrana permeabili allo ione cloro, ed il meccanismo di inibizione richiede l'ingresso di ioni cloro che, portando cariche negative all'interno del neurone, ne riducono l'attività. Il dogma al centro della nostra conoscenza del meccanismo di inibizione neuronale è che in condizioni fisiologiche, il rilascio di GABA causa sempre l'entrata di cloro nei neuroni postsinaptici. L'unica eccezione fisiologica a questa regola è durante lo sviluppo

embrionale e post natale quando la concentrazione di cloro all'interno dei neuroni è alta ed il GABA ad una azione tale da facilitare l'eccitazione neuronale.

Questo schema è messo in discussione da nostri dati preliminari in cui, utilizzando una nuova tecnica che abbiamo sviluppato in questi ultimi anni, abbiamo misurato direttamente la concentrazione di cloro intracellulare mediante microscopia a due fotoni nel cervello intatto. In questi esperimenti dimostriamo che la regolazione del cloro nei neuroni eccitatori è molto più dinamica di quanto ci si aspettasse in quando abbiamo osservato che nella corteccia del topo adulto il cloro segue una oscillazione giornaliera: il cloro è molto basse durante le ore centrali del giorno (il periodo di riposo naturale per il topo), ed aumenta durante la notte, il periodo di maggiore attività. Questa oscillazione fisiologica è accompagnata da una modulazione dell'attività inibitoria e dalle caratteristiche dell'attività elettrica corticale.

In questo progetto esploreremo il ruolo e le possibili alterazioni di questa regolazione ciclica del cloro in modelli mogenici di deficit cognitivo ed autismo per mezzo di fisiologia ed imaging in vivo con l'obiettivo di costruire un solido razionale all'idea di utilizzare il cloro come bersaglio farmacologico per il trattamento di deficit cognitivi.

Sulis Sato S, et al. (2017) Simultaneous two-photon imaging of intracellular chloride concentration and pH in mouse pyramidal neurons in vivo. Proc Natl Acad Sci 114(41):201702861.

Ritardo mentale X-linked, Macroencefalia/Autismo

Coordinator: Gian Michele Ratto

Partner: Claudia Lodovichi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19281

**Disease Name:**

Mental Retardation, X-linked; Macrocephaly/Autism

**Keywords:**

Cortical computation, Animal model creation study, Drug repurposing

## Poster P.09.58

### NEURONAL DYSFUNCTIONS UNDERLYING PHELAN-MCDERMID SYNDROME AND THEIR RESCUE BY GENETIC AND PHARMACOLOGICAL MODULATION OF MGLU5 SIGNALING

Giona F.<sup>[1]</sup>, Vinci E.<sup>\*[1]</sup>, Ponzoni L.<sup>[1]</sup>, Tozzi A.<sup>[2]</sup>, Sala M.<sup>[1]</sup>, Jones C.<sup>[3]</sup>, Boeckers T.<sup>[4]</sup>, Verpelli C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>CNR Neuroscience Institute ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Perugia ~ Perugia ~ Italy, <sup>[3]</sup>Vanderbilt Center for Neuroscience Drug Discovery ~ Vanderbilt ~ United States of America, <sup>[4]</sup>Institute for Anatomy and Cell Biology, Ulm University ~ Ulm ~ Germany

Shank proteins are large scaffold proteins located at post-synaptic density (PSD) of excitatory synapses which have a crucial role in formation, maturation and function of synapses. It is known that haploinsufficiency of SHANK3 is the major cause of neurological symptoms associated with Phelan-McDermid Syndrome (PMS), which include hypotonia, speech delay and autistic behaviour. Indeed, we recently demonstrated that SHANK3 is essential to mediate mGlu5 receptor signalling by recruiting Homer1b/c, another scaffold protein, to the PSD (Vidomoni et al. 2017). In order to better clarify if positive allosteric modulators (PAMs) of mGlu5 might rescue the synaptic and behavioral alterations of Shank3 KO mice we tested the ability of VU0409551, a potent and selective positive allosteric modulator of mGlu5 receptor, to rescue behavioural and synaptic dysfunction in Shank3 $\Delta$ 11  $-/-$  mice. We found that the acute treatment with VU0409551 rescues repetitive and stereotyped behaviours, social impairments and intellectual inflexibility observed in Shank3 $\Delta$ 11  $-/-$  mice. Moreover, we found a specific reduction of activity dependent protein translation, measured by SUnSET methodology, in cortex and striatum of Shank3 $\Delta$ 11  $-/-$  mice that can be rescued by chronic treatment with VU0409551. In summary our results suggest that mGlu5 signalling is impaired in Shank3 $\Delta$ 11  $-/-$  mice and that mGlu5 PAMs may represent a new pharmacologic approach for ameliorating symptoms patients affected by PMS.

Caratterizzazione dell'attività di farmaci attivatori del recettore metabotropo di tipo 5 per migliorare i difetti neurologici della sindrome di Phelan McDermid

La sindrome di Phelan-McDermid, è una malattia genetica, al momento priva di cura, caratterizzata da disabilità intellettiva, tratti autistici, ipotonia muscolare, ritardo nello sviluppo e linguaggio assente o estremamente ridotto. Il numero crescente di pazienti diagnosticati suggerisce che tale sindrome possa rappresentare una forma comune di autismo e disabilità intellettiva. La perdita di una copia del gene Shank3 che codifica per una proteina strutturale, localizzata nelle sinapsi del sistema nervoso centrale e coinvolta nella formazione delle spine dendritiche è considerata la causa principale dei sintomi neurologici dei pazienti affetti da tale sindrome. I nostri dati preliminari suggeriscono che alterazioni nelle vie di segnale mediate dall'attivazione del recettore metabotropo di tipo 5 (mGlu5), dovute alla mancata formazione del complesso mGlu5-Homer-Shank, siano responsabili dei difetti funzionali e comportamentali che osserviamo nel topo KO per Shank3. Lo scopo principale di questo progetto è di comprendere se strategie farmacologiche basate sul potenziamento dell'attività di mGlu5 possano migliorare i deficit cognitivi dei pazienti PMS. In questo studio verranno utilizzati due modelli complementari. L'utilizzo del topo KO per Shank3 ci permetterà di chiarire, in vivo, Come ed in quali aree del cervello l'assenza di Shank3 altera l'attività di mGlu5 e se il trattamento con attivatori di mGlu5 è in grado di migliorare i difetti cognitive riscontrati nel topo KO per Shank3. L'utilizzo dei neuroni derivati delle cellule iPS di pazienti con PMS ci darà l'opportunità di verificare se i difetti evidenziati nel topo KO per Shank3 sono presenti anche in neuroni umani e possono essere corretti



tramite il trattamento con attivatori del recettore mGlu5. Questo progetto è uno studio preclinico, essenziale per sviluppare terapie specifiche ed efficaci, basate sulla attivazione di mGlu5, per migliorare i sintomi neurologici causati dalla delezione del gene Shank3.

Vicidomini C, Ponzoni L, Lim L, Schmeisser M, Reim D, Morello N, Orelanna D, Tozzi A, Durante V, Scalmani P, Mantegazza M, Genazzani AA, Giustetto M, Sala M, Calabresi P, Boeckers TM, Sala C, Verpelli C (2017) Pharmacological enhancement of mGlu5 receptors rescues behavioral deficits in SHANK3 knock-out mice. *Mol Psychiatry* 22:689-702.

Sindrome di Phelan McDermid o delezione 22q13

Coordinator: Chiara Verpelli

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16131

**Disease Name:**

Phelan McDermid Syndrome

**Keywords:**

Autism, excitatory neurons, Homer

## Poster P.09.59

### EXPLOITING WHOLE-BRAIN STRATEGIES OF GENE THERAPY AND NOVEL THERAPEUTIC TARGETS IN RETT SYNDROME MOUSE MODELS

Luoni M.<sup>[1]</sup>, Giannelli S.<sup>[1]</sup>, Indrigo M.<sup>[1]</sup>, Massimino L.<sup>[1]</sup>, Gregori S.<sup>[2]</sup>, Broccoli V.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Telethon Institute for Gene Therapy (TIGET) ~ Milano ~ Italy

Rett syndrome (RTT) is an incurable neuroinfantile disorder caused by mutations in the gene encoding for methyl-CpG binding-protein 2 (MECP2). Gene therapy for this disease presents inherent hurdles since MECP2 is expressed throughout the brain and its duplication leads to severe neurological conditions as well. However, the recent introduction of PHP.eB, an engineered capsid with an unprecedented efficiency in crossing the blood-brain barrier upon intravenous injection, has provided an invaluable vehicle for gene transfer in the mouse nervous system. Herein, we use PHP.eB to deliver a novel instable *Mecp2* (i*Mecp2*) transgene cassette which prevents supraphysiological MeCP2 protein levels in transduced neural tissues by increasing RNA destabilization and inefficient protein translation of the viral *Mecp2* transgene. Intravenous injections of the PHP.eB-i*Mecp2* virus in symptomatic male and female *Mecp2* mutant mice resulted in complete protection from disease progression with improved locomotor activity, coordination, lifespan and normalization of altered gene expression and mTOR signaling. Remarkably, PHP.eB-i*Mecp2* administration was safe in female *Mecp2* mutant and wild-type animals at all viral doses with only a marginally increase in MeCP2 protein levels throughout the brain. In contrast, we observed a strong immune response to the transgene in treated male *Mecp2* mutant mice that was overcome by immunosuppression. Overall, PHP.eB-mediated delivery of the i*Mecp2* cassette provided widespread and efficient gene transfer maintaining physiological MeCP2 protein levels in the brain. This combination defines a novel viral system with strong therapeutic efficacy and increased safety holding important clinical implications for RTT.

### NUOVE STRATEGIE DI TERAPIA GENICA E NUOVI OBIETTIVI TERAPEUTICI PER LA SINDROME DI RETT

La sindrome di Rett (RTT) è una malattia neuroinfantile incurabile causata da mutazioni nel gene che codifica per la proteina methyl-CpG binding-protein 2 (MECP2). La terapia genica per questa malattia presenta ostacoli intrinseci poiché MECP2 è espresso in tutto il cervello e la sua duplicazione porta anche a gravi condizioni neurologiche. Tuttavia, la recente introduzione di PHP.eB, un capside virale ingegnerizzato con un'efficienza senza precedenti nell'attraversare la barriera emato-encefalica dopo iniezione endovenosa, ha fornito un veicolo prezioso per il trasferimento genico nel sistema nervoso del topo. In questo studio abbiamo messo a punto una nuova cassetta instabile del transgene *Mecp2* (i*Mecp2*) che previene i livelli sopra-fisiologici della proteina MeCP2 nei tessuti neurali trasdotti aumentando la destabilizzazione dell'RNA e la traduzione inefficiente delle proteine del transgene *Mecp2* virale. Iniezioni endovenose del virus PHP.eB-i*Mecp2* in topi sia maschi che femmine mutanti *Mecp2* sintomatici hanno portato a una protezione completa dalla progressione della malattia con una migliore attività locomotoria, coordinamento, durata della vita e normalizzazione dell'espressione genica alterata e segnalazione mTOR. Sorprendentemente, la somministrazione di PHP.eB-i*Mecp2* si è dimostrata sicura in mutanti *Mecp2* femmina ed animali di controllo a tutte le dosi virali con un aumento solo marginale dei livelli di proteine MeCP2 in tutto il cervello. Al contrario, abbiamo osservato una forte risposta immunitaria al transgene nei topi mutanti *Mecp2* maschi trattati che è

stata superata solo con un trattamento di immunosoppressione. Complessivamente, la cassetta iMecp2 nel virus terapeutico PHP.eB ha fornito un trasferimento genico diffuso ed efficiente mantenendo i livelli fisiologici della proteina MeCP2 nel cervello. Questa combinazione definisce un nuovo sistema virale con una forte efficacia terapeutica e una maggiore sicurezza con importanti implicazioni cliniche per la RTT.

1) MECP2 disorders: from the clinic to mice and back.

Lombardi LM, Baker SA, Zoghbi HY.

J Clin Invest. 2015 Aug 3;125(8):2914-23.

2) Rett syndrome: a complex disorder with simple roots.

Lyst MJ, Bird A.

Nat Rev Genet. 2015 May;16(5):261-75.

3) Rett Syndrome: Crossing the Threshold to Clinical Translation.

Katz DM, Bird A, Coenraads M, Gray SJ, Menon DU, Philpot BD, Tarquinio DC.

Trends Neurosci. 2016 Feb;39(2):100-113.

Sindrome di Rett

Coordinator: Vania Broccoli

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19038

**Disease Name:**

Rett Syndrome

**Keywords:**

Rett syndrome, Gene therapy, neurological dysfunctions

## Poster P.09.60

### ALTERED L-TYPE CHANNEL GATING, ACTION POTENTIAL FIRING AND EXCITATORY/INHIBITORY SYNAPTIC RESPONSES IN HIPPOCAMPAL NEURONS OF THE AUTISTIC TIMOTHY SYNDROME TYPE-2 MOUSE

Calorio C.<sup>[1]</sup>, Hidisoglu E.<sup>[2]</sup>, Chiantia G.<sup>[1]</sup>, Gavello D.<sup>[1]</sup>, Salio C.<sup>[1]</sup>, Sassoè--Pognetto M.<sup>[1]</sup>, Defilippi P.<sup>[1]</sup>, Balzac F.<sup>[1]</sup>, Turco E.<sup>[1]</sup>, Bett G.C.L.<sup>[3]</sup>, Rasmusson R.L.<sup>[3]</sup>, Marcantoni A.<sup>[1]</sup>, Carbone E.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Torino ~ Torino ~ Italy, <sup>[2]</sup>Akdeniz Üniversitesi ~ ANTALYA ~ Turkey, <sup>[3]</sup>Dept. of Physiol. & Biophysics, The State Univ. of New York ~ Buffalo NY ~ United States of America

Tymothy syndrome (TS) is a multisystem disorder featuring cardiac arrhythmias, autism and adrenal gland dysfunction that originates from a de novo point mutation in the gene encoding the Cav1.2 (CACNA1C) L-type channel [1, 2]. Using the autistic TS2-neo mouse bearing the G406R point mutation associated with TS type-2 [3], we have recently shown that the mutation reduces the rate of inactivation and shifts leftward the activation and inactivation of L-type channels, causing marked increase of resting Ca<sup>2+</sup> influx ('window' Ca<sup>2+</sup> current) of adrenal mouse chromaffin cells (MCCs). The increased 'window current' causes marked reduction of Nav channel density, switches normal tonic firing to abnormal burst firing, reduces mitochondrial metabolism, induces cell swelling and decreases catecholamine release. Overnight incubation with nifedipine restores Nav channel density, normal MCC firing and quantity of catecholamine released [4].

Here we report that in cultured hippocampal neurons (HNs; 3-10 days-in-vitro) of TS2-neo mutated mice [5], L-type calcium currents were less inactivated during pulses of 1 s to +10 mV. The voltage-dependence of activation and steady-state inactivation were both leftward shifted (-6 and -11 mV, respectively), as reported for MCCs. The shifts generated an increased resting window Ca<sup>2+</sup> current. Immunolabeling of pyramidal and GABAergic neurons indicated a 15% loss of pyramidal neurons and a 8% loss of interneurons in TS2-neo cultures compared to WT. Current-clamp data analysis indicated the existence of two groups of neurons: a "slow-spiking" that was predominant in WT cultures and a "fast-spiking" that was predominant in TS2 cultures. The TS2-mutation increased the mean firing frequency of both groups but reduced to about 50% the number of HNs able to fire more than two APs, even under sustained depolarization.

In pharmacologically isolated GABAergic mono-synapses of 12-18 DIV [6], the amplitude of electrically-induced IPSCs increased by 72% and the pair-pulse depression increased by 39% at 25 ms pulse separation in mutated HNs. In isolated glutamatergic neurons of 15-18 DIV forming self-synapses (autapses) [7], the electrically evoked EPSCs associated to AMPA receptors increased by 74% in mutated neurons. Peak-variance fluctuation analysis (PVFA) [8] of mEPSCs shows that the increased amplitude of EPSCs could be partially due to a 56% increase of single AMPA receptors conductance and not to an increased number of expressed AMPA receptors. In conclusion, the L-type channel gating changes induced by the TS2-type mutation of CACNA1C gene is most likely responsible for the increased resting window Ca<sup>2+</sup> current, which results in reduced neuronal viability, altered excitability and "gain of function" of both GABAergic and glutamatergic synaptic responses.

La sindrome di Tymothy (TS) è un disordine multisistemico che si manifesta attraverso aritmie cardiache, autismo e disfunzioni della ghiandola surrenale. La sindrome origina da una mutazione de novo del gene CACNA1C che codifica per il canale del calcio Cav1.2 di tipo L [1, 2]. Utilizzando il topo

autistico TS2-neo a cui è stata indotta la mutazione G406R associata alla TS di tipo 2 (TS2) [3], abbiamo dimostrato che la mutazione TS2 riduce l'inattivazione e sposta verso potenziali più negativi la voltaggio dipendenza dei canali L, causando aumentati flussi di Ca<sup>2+</sup> ("window current") in cellule cromaffini di topo. L'aumentata "window current" causa riduzione della densità dei canali del sodio (Nav), induce "bursts" di potenziali d'azione (PA), riduce il metabolismo mitocondriale, induce rigonfiamento cellulare e diminuisce il rilascio di catecolamine. Trattamenti cronici con nifedipina per 18 ore ripristinano la densità dei Nav, la normale eccitabilità delle cellule e la quantità di catecolamine rilasciate [4].

Qui riportiamo che in neuroni ippocampali (NI) mantenuti in coltura per 3-10 giorni (DIV) del topo mutato TS2-neo, le correnti L sono meno inattivanti. Come nelle cellule cromaffini, la voltaggio dipendenza dell'attivazione e dell'inattivazione sono spostate a sinistra (-6 e -11 mV), causando un'aumentata "window current". Il conteggio di neuroni piramidali e interneuroni inibitori immunomarcati per il GABA e il glutammato suggerisce una perdita del 15% di neuroni piramidali e dell'8% di interneuroni GABAergici in colture di NI TS2-neo mutati rispetto ai WT. Misure di PA in current-clamp suggeriscono l'esistenza di due gruppi di neuroni: un tipo "slow-spiking", predominante in colture WT e un tipo "fast-spiking", predominante in colture TS2-neo. La mutazione TS2 aumenta la frequenza media dei PA di entrambi i gruppi di neuroni ma riduce di circa il 50% il numero di neuroni in grado di generare più di due PA.

In preparati monosinaptici di neuroni GABAergici di 12-18 DIV [5], l'ampiezza degli IPSCs evocati elettricamente aumenta del 72% in neuroni mutati, mentre la depressione indotta da doppi impulsi aumenta del 39% quando i due impulsi sono separati da 25 ms. Parallelamente, in autopsi di neuroni glutamatergici isolati (15-18 DIV) [6], l'ampiezza degli EPSCs associati ai recettori AMPA aumenta del 74% in neuroni mutati. Un'analisi delle fluttuazioni del picco e della varianza degli mEPSCs [7], suggerisce che l'aumentata ampiezza degli EPSCs è verosimilmente dovuta ad un aumento della conduttanza dei recettori AMPA (56%) piuttosto che ad un aumento dei recettori AMPA espressi. In conclusione, i cambi delle proprietà cinetiche dei canali del calcio di tipo L indotte dalla mutazione TS2 sono responsabili dell'aumentata "window current" che causa un ridotto numero di neuroni funzionanti, un'alterata eccitabilità e un "gain-of-function" di entrambe le risposte sinaptiche GABAergiche e glutamatergiche in neuroni ippocampali in coltura.

1. Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, et al. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102:8089-96.
2. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, et al. Ca(v)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004; 119:19-31.
3. Bader PL, Faizi M, Kim LH, Owen SF, Tadross MR, Alfa RW, et al. Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:15432-7.
4. Calorio C, Gavello D, Guarina L, Salio C, Sassoe-Pognetto M, Riganti C, et al. Impaired chromaffin cell excitability and exocytosis in autistic Timothy syndrome TS2-neo mouse rescued by L-type calcium channel blockers. *The Journal of physiology* 2019; 597:1705-33.
5. Gavello D, Rojo-Ruiz J, Marcantoni A, Franchino C, Carbone E, Carabelli V. Leptin Counteracts the

Hypoxia-Induced Inhibition of Spontaneously Firing Hippocampal Neurons: A Microelectrode Array Study. Plos One 2012; 7.

6. Russo I, Gavello D, Menna E, Vandael D, Veglia C, Morello N, et al. p140Cap Regulates GABAergic Synaptogenesis and Development of Hippocampal Inhibitory Circuits. Cerebral cortex (New York, NY : 1991) 2019; 29:91-105.

7. Ripoli C, Cocco S, Li Puma DD, Piacentini R, Mastrodonato A, Scala F, et al. Intracellular accumulation of amyloid-beta (Abeta) protein plays a major role in Abeta-induced alterations of glutamatergic synaptic transmission and plasticity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 2014; 34:12893-903.

8. Baldelli P, Hernandez-Guijo JM, Carabelli V, Carbone E. Brain-derived neurotrophic factor enhances GABA release probability and nonuniform distribution of N- and P/Q-type channels on release sites of hippocampal inhibitory synapses. Journal of Neuroscience 2005; 25:3358-68.

Sindrome di Timothy

Coordinator: Emilio Carbone

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15110

**Disease Name:**

Timothy Syndrome

**Keywords:**

Autism, L-type calcium channels, GABAergic glutamatergic synapsis

## Poster P.09.61

### MECHANISTIC DISSECTION OF POLYCOMB-DEPENDENT DYSREGULATION IN WEAVER SYNDROME NEURAL LINEAGES

Trattaro S.<sup>[1]</sup>, Vitriolo A.<sup>[1]</sup>, Gibson W.T.<sup>[3]</sup>, Weksberg R.<sup>[2]</sup>, Testa G.<sup>[1]</sup>, López Tobón A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Europeo di Oncologia ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>The hospital for sick children ~ Toronto ~ Canada, <sup>[3]</sup>BC Childrens hospital research institute ~ British Columbia ~ Canada

Weaver syndrome (WS) is a rare and so far, neglected disease characterized by overgrowth and intellectual disability, recently associated to mutations in the different components of the Polycomb complex, well-known repressor of gene expression in vertebrates. While much is known about the function of its catalytic unit Ezh2 in orchestrating developmental programs, there is no understanding of how the heterozygous mutations found in WS bring about disease phenotypes. The reason is twofold. First, as most functional studies were performed in Ezh2 homozygous null mice and cells, we do not know how one mutant Ezh2 allele impacts the global landscape of H3K27 methylation. Second, virtually nothing is known about the role of Ezh2 in developing human neurons which could underlie the intellectual disability, a major feature of WS that poses a significant burden for patients and families. In this project we pilot a new approach that addresses these unmet needs through the combination of two advanced technologies: i) differentiation of patient' reprogrammed lines into disease-relevant neural lineages (cortical organoids, postmitotic neurons and neural crest stem cells); and ii) a phenotypic profiling and validation of candidate biological processes found to be robustly and overlappingly aberrant across WS neural lineages, after their comprehensive transcriptional characterization. Through functional validation and scoring of these phenotypes, in combination single cell transcriptome sequencing to identify population-specific alterations and validated by a parallel system of gene activation/inactivation, we aim to a hierarchical definition of high-confidence drivers of these phenotypes and propose mechanistic strategies that pave the way to their pre-validation as possible therapeutic targets.

Studio della deregolazione dipendente da Polycomb nella sindrome di Weaver tramite l'uso di tipi cellulari neurali derivati da paziente.

La sindrome di Weaver è una malattia rara caratterizzata da eccessiva crescita, anomalie craniofacciali e disabilità intellettiva ancora oggi poco studiata. Recentemente, è stata associata a mutazioni in diverse componenti del complesso proteico "PRC2", noto per la sua azione di silenziamento genico. Ad oggi, non si sa ancora come queste mutazioni possano causare la malattia, anche se è noto che PRC2 è importante per lo sviluppo di molti tipi cellulari, fra cui i neuroni. Molti studi sono stati condotti annullando completamente la funzione di EZH2, la subunità più importante di PRC2 e indispensabile per la sua funzione, rappresentando una condizione sperimentale molto diversa da quella dei pazienti affetti, i quali hanno mutazioni di cui non conosciamo gli effetti sul funzionamento della proteina e che per di più si verificano in solo una delle due copie di EZH2. Per studiare a fondo le cause della disabilità intellettiva tipica di questa malattia, in questo progetto utilizzeremo cellule staminali derivate da pazienti per spingerle a diventare neuroni. Faremo uso della tecnologia degli organoidi cerebrali, strutture tridimensionali che ricapitolano i vari stadi di sviluppo del cervello embrionale. Inoltre, spingeremo queste cellule staminali a diventare anche precursori delle strutture della faccia, visti i severi dismorfismi facciali caratteristici dei pazienti Weaver. Questi modelli

sperimentali ci permetteranno di capire quali processi biologici sono alla base della malattia aiutandoci ad identificare alcuni possibili bersagli terapeutici su cui andremo ad interferire tramite ingegneria genetica e farmacologicamente per capire la loro potenzialità nella cura della sindrome di Weaver.

Adamo A, Atashpaz A, Germain PL, Zanella M, D'Agostino G, Albertin V, Chenoweth J, Micale L, Fusco F, Unger C, Augello B, Palumbo O, Hamilton B, Carella M, Donti E, Pruneri G, Selicorni A, Biamino E, Prontera P, McKay R, Merla G and Testa G, 7q11.23 dosage-dependent dysregulation in human pluripotent stem cells affects transcriptional programs in disease-relevant lineages, *Nat Genet*, 47: 132-141.

Al-Salem A, Alshammari MJ, Hassan H, Alazami AM, Alkuraya FS. 2013, Weaver syndrome and defective cortical development: a rare association. *Am J Med Genet A*. 1:225-227.

Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R., 2006, Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells, *Nature*, 18: 349- 53.

Gibson WT, Hood RL, Zhan SH, Bulman DE, Fejes AP, Moore R, Mungall AJ, Eydoux P, Babul-Hirji R, An J, Marra MA, FORGE Canada Consortium, Chitayat D, Boycott KM, Weaver DD, and Jones SJ, 2012, Mutations in EZH2 Cause Weaver Syndrome, *The American Journal of Human Genet*, 90: 110–118.

Weaver DD, and Gibson WT, 2015, Weaver Syndrome-Associated EZH2 Protein Variants Show Impaired Histone Methyltransferase Function In Vitro, *Hum Mutat*, 37: 301-307.

Sindrome di Weaver

Coordinator: Alejandro López Tobón

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19295

**Disease Name:**

Weaver Syndrome

**Keywords:**

Weaver syndrome, Transcriptomics, Cortical development



## Poster P.09.62

### SPOTLIGHT ON LATERAL HABENULA (LHB) FUNCTION IN TETRASPANIN7 (TSPAN7) KNOCK-OUT MICE

Murru L.\*<sup>[1]</sup>, Ponzoni L.<sup>[2]</sup>, Longatti A.<sup>[1]</sup>, Sala M.<sup>[3]</sup>, Passafaro M.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>CNR Institute of Neuroscience ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Fondazione Zardi Gori ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>~ Italy

Mutations in many genes have been linked to increased risk of developing Intellectual disability (ID) and autism spectrum disorders (ASD) so far, including Tm4sf2 that encodes for tetraspanin7 (TSPAN7) protein (Zemni R. et al. 2000; Piton A. et al 2011). Often, ID and ASD share clinical and genetic components resulting in high comorbidity. In line with these observations, patients displaying mutated tm4sf2 gene has been diagnosed for ID and ASD (Zemni R. et al. 2000; Piton A. et al 2011). We previously demonstrated defects in hippocampal function and related behaviors in Tm4sf2 knock-out (Tm4sf2-/y) mice (Bassani S. et al 2012; Murru L. et al. 2017).

Recently, the lateral habenula (LHb) has emerged as master regulator of several brain areas, such as the limbic system and monoaminergic nuclei, known to regulate behaviors that are impaired in neuropsychiatric disorders, including behavioral flexibility and sociability.

For these reasons, the aim of the project is to unravel a possible link between ASD-like behaviors and lateral habenula (LHb) function in Tm4sf2-/y mice.

In preliminary results, Tm4sf2-/y mice showed a minor sociability, increased self-grooming, altered marble burying, decreased sucrose preference and increased depressive-like state. Moreover, functional experiments showed a strong hypo-excitability, an aberrant neuronal firing pattern and altered potassium and sodium conductances in LHb neurons of Tm4sf2-/y mice.

With our data, we suggest that an altered LHb activity could be causative for aberrant behavioral phenotypes common with ASD.

Funzionalità della Lateral Habenula (LHb) negli animali knock-out per tetraspanin7 (TSPAN7)

Mutazioni in diversi geni sono state associate a un aumentato rischio di sviluppare disabilità intellettive (ID) e disordini dello spettro autistico (ASD), che includono anche quelle a carico di tm4sf2 che codifica per la proteina tetraspanin7 (TSPAN7) (Zemni R. et al. 2000; Piton A. et al 2011). Spesso, ID e ASD condividono componenti genetiche e cliniche risultando in un'alta comorbidità. In linea con queste osservazioni, i pazienti che posseggono il gene tm4sf2 mutato sono stati diagnosticati per ID e ASD (Zemni R. et al. 2000; Piton A. et al 2011). Precedentemente il nostro gruppo ha dimostrato difetti nella funzionalità ippocampale e nei comportamenti associati all'ippocampo nei topi tm4sf2 knock out (Tm4sf2-/y) (Bassani S. et al 2012; Murru L. et al. 2017).

Recentemente, la Lateral habenula (LHb) è emersa come principale regolatore di alcune aree del cervello, come il Sistema limbico e I nuclei monoamminergici, conosciuti per regolare alcuni comportamenti alterati nei disturbi neuropsichiatrici, includendo la sociabilità e la flessibilità comportamentale.

Per queste ragioni, l'obiettivo del progetto è svelare un possibile collegamento tra ASD e funzionalità della LHb nei topi Tm4sf2-/y.

Dati preliminari hanno mostrato una minore socievolezza, un aumento dei comportamenti ripetitivi, un'accentuata anhedonia e un aumentato comportamento simil-depressivo sui topi Tm4sf2-/y. Inoltre, esperimenti funzionali hanno mostrato una forte ipoeccitabilità, un aberrante attività neuronale e

conduttanze del sodio e del potassio alterate nei neuroni della LHb degli animali Tm4sf2-/y.  
Con i nostri dati, noi suggeriamo che un'alterata attività della LHb potrebbe essere causa per i fenotipi comportamentali riscontrati nei disordini dello spettro autistico.

- 1) Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrie A, Billuart P, McDonell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, et al. 2000. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet.* 24:167–170.
- 2) Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, Lafreniere RG, Yang Y, Henrion E, Laurent S, Noreau A, Thibodeau P, Karemera L, et al. 2011. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 16:867–880.
- 3) Bassani S, Cingolani LA, Valnegri P, Folci A, Zapata J, Gianfelice A, Sala C, Goda Y, Passafaro M. 2012. The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking. *Neuron.* 73:1143–1158.
- 4) Murru L, Vezzoli E, Longatti A, Ponzoni L, Falqui A, Folci A, Moretto E, Bianchi V, Braidà D, Sala M, D'Adamo P, Bassani S, Francolini M, Passafaro M. Pharmacological Modulation of AMPAR Rescues Intellectual Disability-Like Phenotype in Tm4sf2-/y Mice. *Cereb Cortex.* 2017 Nov 1;27(11):5369-5384. doi: 10.1093/cercor/bhx221.

Disabilità intellettiva

Coordinator: Maria Passafaro

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GGP17283

**Disease Name:**

X-linked Intellectual Disability

**Keywords:**

Lateral habenula, autism spectrum disorder, ion channels

# **10\_Genetic neurological disorder\Neurodegenerative diseases**

## Poster P.10.63

### ALTERATION OF LYSOSOMES AND OF LYSOSOMAL ACTIVITY IN CHARCOT-MARIE-TOOTH 2B PERIPHERAL NEUROPATHY

Romano R.<sup>[1]</sup>, Rivellini C.<sup>[2]</sup>, De Luca M.<sup>[1]</sup>, Tonlorenzi R.<sup>[2]</sup>, Beli R.<sup>[1]</sup>, Manganelli F.<sup>[3]</sup>, Nolano M.<sup>[4]</sup>, Santoro L.<sup>[3]</sup>, Eskelinen E.<sup>[5]</sup>, Previtali S.C.<sup>[2]</sup>, Bucci C.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Salento ~ Lecce ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Naples "Federico II" ~ Naples ~ Italy, <sup>[4]</sup>Salvatore Maugeri Foundation ~ Benevento ~ Italy, <sup>[5]</sup>University of Turku ~ Turku ~ Finland

Charcot-Marie-Tooth type 2B (CMT2B) is a rare autosomal-dominant axonal disorder affecting the peripheral nervous system and characterized by distal weakness, muscle atrophy, prominent sensory loss, foot ulcerations and recurrent infections leading to toe amputations, and for this reason also classified as ulcero-mutilating neuropathy [1, 2]. CMT2B is caused by 5 mutations (L129F, K157N, N161T/I, V162M) of the RAB7A gene, encoding a small GTPase of the RAB family that controls late endocytic trafficking regulating maturation of endosomes, transport from early endosomes to lysosomes, biogenesis of lysosomes and clustering and fusion of late endosomes and lysosomes in the perinuclear region. Controlling these steps of endocytosis RAB7 impacts on several other cellular processes and, in particular, it plays important roles in neurons, regulating neurotrophin trafficking and signaling, neurite outgrowth and neuronal migration [3-5]. The CMT2B-causing RAB7 mutant proteins were previously characterized and it was established that they show altered nucleotide Koff and inhibited GTPase activity per binding event [6-8]. Also they exhibit altered interaction with several RAB7 effector proteins and they inhibit neurite outgrowth and autophagy [9-12]. As several neurodegenerative diseases are caused by lysosomal dysfunctions, we decided to investigate whether CMT2B-causing RAB7A mutations alter the activity of these organelles. Thus, we used healthy and CMT2B skin fibroblasts carrying the Rab7V162M mutation and we investigated expression of endocytic proteins, signaling receptor degradation and lysosomal activity. We found that CMT2B fibroblasts exhibited higher expression of late endocytic proteins, such as LAMP proteins, and of lysosomal enzymes, such as cathepsins. Moreover, in CMT2B cells we found higher activity of cathepsin B, D and L and, using DQ-BSA, we confirmed higher lysosomal activity. Also in CMT2B cells there was higher epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation compared to control fibroblasts and, as expected, EGFR signalling pathways were downregulated. This is of importance considering the neurotrophic functions of EGFR and its important role in neuronal survival, in particular after injury. In addition, we found in CMT2B cells an increased number of lysosomes. Therefore, our data demonstrate higher lysosomal activity in CMT2B cells. We also differentiated sensory neurons from induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from skin fibroblasts of healthy controls and of patients and we confirmed these data demonstrating that patient neurons show higher lysosomal activity compared to neurons of healthy individuals. Thus, considering that hyperactivation of degradation can induce a premature termination of signaling possibly contributing to axonal degeneration, our data suggest that higher lysosomal activity leads to neurodegeneration in CMT2B.

ALTERAZIONI DEI LISOSOMI E DELLA FUNZIONALITÀ LISOSOMALE NELLA NEUROPATIA PERIFERICA CHARCOT-MARIE-TOOTH DI TIPO 2B.

La malattia Charcot-Marie-Tooth di tipo 2B (CMT2B) è una rara patologia che colpisce il sistema nervoso periferico causando debolezza, atrofia muscolare e accentuata perdita sensoriale

principalmente a carico degli arti inferiori. Questa neuropatia periferica è anche caratterizzata da frequenti ulcere e infezioni ai piedi che portano spesso all'amputazione delle dita dei piedi e per questo motivo questa patologia è anche identificata come patologia ulcero-mutilante. La neuropatia periferica CMT2B è causata da 5 mutazioni nel gene codificante la proteina RAB7, una proteina che lega ed idrolizza il nucleotide GTP e che gioca un ruolo importante per la genesi e la funzionalità dei lisosomi, i compartimenti digestivi della cellula. In precedenza abbiamo caratterizzato le proprietà biochimiche e funzionali delle proteine RAB7 mutate che causano la CMT2B scoprendo che presentano dei difetti nel legame al nucleotide e nell'attività di idrolisi del GTP per evento di legame. Inoltre, queste proteine mutate presentano un'alterata interazione con alcuni effettori di RAB7 oltre al fatto che la loro espressione inibisce la crescita dei neuriti. Considerando che il funzionamento non ottimale dei lisosomi è causa di altre malattie neurodegenerative abbiamo deciso di investigare se questi compartimenti cellulari funzionassero in modo adeguato nelle cellule dei pazienti. Per questi studi abbiamo usato cellule (fibroblasti) della pelle di individui sani e di pazienti affetti da questa patologia derivandone anche cellule staminali pluripotenti che sono state poi differenziate a neuroni sensoriali, e cioè le cellule nervose interessate dalla patologia. L'analisi dei lisosomi e della loro funzionalità in queste cellule ha permesso di stabilire che le cellule dei pazienti contengono un maggior numero di lisosomi e che c'è una maggiore attività digestiva di questi compartimenti cellulari, attività che porta ad una maggiore degradazione proteica ed in particolare alla degradazione di recettori importanti per la segnalazione cellulare. Infatti, risulta maggiormente degradato in queste cellule il recettore per il fattore di crescita epidermale (EGFR) che svolge normalmente un importante ruolo trofico per la sopravvivenza di vari tipi di cellule nervose ed in particolare delle cellule nervose danneggiate per qualche motivo. I nostri dati dimostrano quindi che le mutazioni a carico della proteina RAB7 che causano la CMT2B alterano i lisosomi e la funzionalità lisosomiale e, considerando che un'aumentata degradazione di recettori per la segnalazione può indurre una prematura terminazione della segnalazione cellulare che potrebbe contribuire alla degenerazione assonale, questo suggerisce che l'aumentata attività degradativa dei lisosomi possa portare alla neurodegenerazione nella CMT2B.

1. Laura, M. et al., Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders: an evolving landscape. *Curr Opin Neurol*, 2019. 32(5): p. 641-650.
2. Bucci, C. et al., Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic. *Prog Neurobiol*, 2012. 99: p. 191-225.
3. Saxena, S. et al., The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci*, 2005. 25(47): p. 10930-10940.
4. Deinhardt, K. et al., Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*, 2006. 52(2): p. 293-305.
5. Kawauchi, T. et al., Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron*, 2010. 67(4): p. 588-602.
6. Spinosa, M.R. et al., Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *J Neurosci*, 2008. 28(7): p. 1640-1648.
7. De Luca, A. et al., Characterization of the Rab7K157N mutant protein associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 372(2): p. 283-287.
8. McCray, B.A. et al., Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Hum Mol Genet*, 2010. 19(6): p. 1033-1047.
9. Colecchia, D. et al., Alterations of autophagy in the peripheral neuropathy Charcot-Marie-Tooth type 2B. *Autophagy*, 2018. 14(6): p. 930-941.
10. Cogli, L. et al., Charcot-Marie-Tooth type 2B disease-causing RAB7A mutant proteins show

altered interaction with the neuronal intermediate filament peripherin. *Acta Neuropathol*, 2013. 25(2): p. 257-272.

11. Cogli, L. et al., CMT2B-associated Rab7 mutants inhibit neurite outgrowth. *Acta Neuropathol*, 2010. 120(4): p. 491-501.

12. Cogli, L. et al., Vimentin phosphorylation and assembly are regulated by the small GTPase Rab7a. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1833: p. 1283-1293.

Charcot Marie Tooth di tipo 2B

Coordinator: Cecilia Bucci

Partners: Stefano Previtali, Lucio Santoro

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16037

**Disease Name:**

Charcot Marie Tooth Type 2B

**Keywords:**

Charcot-Marie-Tooth type 2B, Lysosome, Epidermal Growth Factor Receptor

## Poster P.10.64

### FULL ATOMISTIC MODEL OF PRION STRUCTURE AND CONVERSION

Biasini E.\*

*Dulbecco Telethon Institute & Dip. CIBIO, University of Trento ~ Trento ~ Italy*

Full atomistic model of prion structure and conversion.

Since their discovery, prions have stood as enigmatic agents that defy the concepts of infectivity and genetic inheritance due to their capacity of propagating conformationally-encoded information in absence of nucleic acids (1). However, after more than 30 years of investigation, the high-resolution structure of prions as well as their mechanism of replication have remained elusive (2). In an attempt to fill this gap, different computational models have been proposed in the past, but they are now inconsistent with recently collected results (2).

In this work, using molecular modelling techniques, we constructed an all-atom model of a mouse prion integrating a wide array of updated experimental constraints, such as: (i) cryo-EM and X-ray fiber-diffraction, showing a folding compatible with a 4-rung- $\beta$ -solenoid (4R $\beta$ S) architecture (3,4); (ii) Circular dichroism and FTIR spectroscopy, which ruled out the presence of  $\alpha$ -helices (5); (iii) Limited proteolysis, which mapped solvent-accessible residues as well as the presence of an intact disulphide bond (6,7); and (iv) The possibility of accommodating complex glycans, which was not accounted in the previous models (8). The stability of the new 4R $\beta$ S model, assessed by Molecular Dynamics (MD) simulations, was found to be comparable to that of the  $\beta$ -solenoid architecture of Het-s, a naturally-occurring prion of yeast. Importantly, we coupled the information of the new 4R $\beta$ S structure with a recently developed path sampling technique to perform a simulation of the conformational transition from PrPC, the normal form of the protein, to PrPSc, the misfolded and infectious conformation (9). The result is a transition pathway with atomistic resolution in which the C-terminal rung of the solenoid acts as a primary conversion surface for the N-terminus of PrPC, followed by a cascade of conformational changes where each newly formed rung templates the formation of the following one, ultimately leading to the complete conversion of PrPC into PrPSc. The new 4R $\beta$ S model, together with the atomistic reconstruction of prion conversion, illuminate how the information encoded into the conformation of a protein could be inherited in a directional fashion, a concept underlying the infectious nature of prions (10). Furthermore, it provides an unprecedented opportunity for the rational design of anti-prion compounds acting by directly targeting the replication process.

Primo Modello Atomistico della Struttura e della Replicazione di un Prione

1. SB Prusiner. Science 1982; 216(4542):136-144.
2. H Wille and JR Requena. Pathogens 2018; 7(1):20
3. E Vazquez Fernandez et al. PLoS Pathog 2016; 12(9):e1005835
4. H Wille et al. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106(40):16990-16995
5. JR Requena and H Wille. Prion 2014; 8(1):60-66
6. E Welker et al. J Biol Chem 2002; 277(36):33477-33481
7. E Vazquez Fernandez et al. PLoS Pathog 2012; 14(1):e1006797
8. IV Baskakov and E Katorcha. Front Neurosci 2016; 10:358
9. G Tiana and C Camilloni. J Chem Phys 2012; 137(23):235101
10. Spagnolli et al. PLoS Pathog 2019; Jul 11;15(7):e1007864

Malattia di Creutzfeldt-Jakob

Coordinator: Emiliano Biasini

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

TCP14009

**Disease Name:**

Creutzfeldt-Jakob Disease

**Keywords:**

Prion, Neurodegeneration, Molecular Dynamics



## Poster P.10.65

### MITOCHONDRIAL CA<sup>2+</sup> UPTAKE IN THE PATHOGENESIS OF FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE

D'Orsi B.<sup>[1]</sup>, Galla L.<sup>[1]</sup>, Greotti E.<sup>[2]</sup>, Beamer E.<sup>[3]</sup>, Alves M.<sup>[3]</sup>, Engel T.<sup>[3]</sup>, Pizzo P.<sup>[1]</sup>, De Stefani D.<sup>[1]</sup>, Tullio P.<sup>[2]</sup>, Rizzuto R.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Neuroscience Institute - Italian National Research Council (CNR) ~ Padova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Department of Physiology & Medical Physics, Royal College of Surgeons in Ireland ~ Dublin ~ Ireland

In Alzheimer's disease (AD), the role of genetic mutations in the pathogenesis is firmly established, despite their role in determining neuronal dysfunction and death is still unknown. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload has been proposed as the no-return signal triggering neuronal death, and we have demonstrated that familial AD (FAD) due to PS2 mutations favors Ca<sup>2+</sup> transfer from the endoplasmic reticulum (ER) to mitochondria. Recently, the molecular nature of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channel was unveiled, allowing the investigation of the role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dysregulation by new genetic tools. Our final goal is to test the genuine contribution of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload to FAD pathogenesis.

To do this, we compared mRNA profiles of the neurotransmitters, cell death pathways and MCU complex (MCUC) components between wild type (WT) and PS2-N141I/APP<sup>swe</sup> (PS2APP) mouse brains, during disease progression. We included PS2KO mice to test if the hypothesis of a loss-of-function phenotype associated to FAD-PS1 mutations can be extended also to FAD-PS2 mutations. PCR arrays reveal an early transcriptional impairment in PS2APP and PS2KO brains, with a non-overlapping profile between them. An early remodelling of the MCU complex was also evident, with a significant up-regulation of the MCUC enhancers. Given the transcriptional remodelling of excitatory neurotransmission, cytosolic Ca<sup>2+</sup> dynamics of hippocampal slices have been studied. An altered NMDA-induced Ca<sup>2+</sup> signalling is evident in 1.5-month-old PS2APP and PS2KO mice. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling is currently under investigation.

As mentioned above, we found increased mRNA levels of genes involved in cell death, together with an up-regulated expression of MCU enhancers. We manipulated MCU protein levels to investigate how mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling controls neuronal death. Since only MCU<sup>+/-</sup> mice are viable and fertile with no evident phenotype, we employed primary neuronal cultures from MCU<sup>+/+</sup> and MCU<sup>+/-</sup> mice. The latter display a decreased mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake and neuronal death in response to NMDA-induced excitotoxicity. We could not detect a decreased cell death when neurons were exposed to a milder and transient NMDA stimulus. In line with this, increasing mitochondrial Ca<sup>2+</sup> levels by overexpressing of MCU is per se sufficient to cause neuronal death in situ and to trigger gliosis and neuronal loss in vivo. Accordingly, MCU<sup>+/-</sup> mice were more resistant to excitotoxicity in vivo, protecting neurons from kainite acid-induced injury (a model of epilepsy).

In summary, our results suggest that a substantial rearrangement of gene expression occurs early in PS2APP and PS2KO mice, especially of those involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death regulation, with no evidence of a loss-of function phenotype associated to FAD-PS2 mutations. Furthermore, we provided important new insights into the role of MCU in neuronal excitotoxicity both in situ and in vivo.

L'accumulo mitocondriale di calcio nella patogenesi delle forme familiari della malattia di Alzheimer

L'Alzheimer è una demenza a lenta evoluzione causata dalla morte delle cellule nervose, con conseguente alterazione del comportamento, perdita della memoria, del linguaggio, che alla fine porta il paziente alla perdita dell'autonomia e morte prematura. Di solito l'Alzheimer si presenta in modo sporadico, senza apparenti cause specifiche, ma in 1 caso su 10 la malattia è determinata da difetti genetici ben precisi (familial Alzheimer's Disease, FAD). I meccanismi che innescano la morte delle cellule nervose non sono ancora noti, ma diverse ipotesi sono state fatte. Questo progetto vuole capire uno di questi meccanismi, ossia il contributo dell'accumulo mitocondriale dello ione  $Ca^{2+}$  alla morte delle cellule nervose. Grazie alla scoperta della vera identità del canale che fa entrare calcio nei mitocondri, abbiamo oggi a disposizione gli strumenti necessari per studiare come il calcio mitocondriale regola la morte neuronale. I dati raccolti fino ad ora da questo progetto evidenziano come aumentando o diminuendo la quantità di canale espresso si possa ottenere una sensibilizzazione o una protezione verso la morte cellulare sia in cellule in coltura che nel cervello di un topo adulto. Inoltre, abbiamo verificato che nei cervelli di animali modello per FAD si verificano alterazioni precoci di geni coinvolti nella neurotrasmissione e nella morte cellulare. Pertanto, sfruttando diversi modelli murini di FAD, abbiamo rilevato alterazioni molto precoci dell'omeostasi dello ione calcio. Ad oggi, abbiamo dunque raccolto dati che sottolineano come la manipolazione dei livelli di calcio nei mitocondri sia in grado di regolare la morte dei neuroni. Abbiamo anche visto che la modifica degli attori cellulari che controllano sia l'omeostasi del calcio che la morte cellulare avvengono precocemente in modelli murini di FAD. Tali alterazioni trascrizionali sono inoltre accompagnate da una variazione funzionale della capacità della cellula di regolare le concentrazioni di calcio. Questi dati supportano quindi l'idea che l'accumulo mitocondriale di calcio sia effettivamente coinvolto nei processi di neurodegenerazione, e che possa quindi rappresentare un nuovo target per lo sviluppo di potenziali nuovi farmaci.

N/A

Malattia di Alzheimer

Coordinator: Rosario Rizzuto

Partner: Tullio Pozzan

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16029

**Disease Name:**

Familial Alzheimer's Disease

**Keywords:**

mitochondria, calcium, Alzheimer

## Poster P.10.66

### DEVELOPMENT OF EXON SPECIFIC U1 snRNA-BASED THERAPY FOR FAMILIAL DYSAUTONOMIA

Riccardi F., Romano G., Bussani E., Vicidomini A., Peretto L., Pagani F.\*

*ICGEB ~ Trieste ~ Italy*

Familial Dysautonomia (FD) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder that severely compromise the autonomic and sensory nervous system with no treatment available. It is caused by a splicing mutation (c.2204+6T>C) in the elongation complex protein 1 gene (ELP1) and the large size of the ELP1 cDNA makes a classical gene therapy approach with adeno-associated virus (AAV) vectors difficult. To directly rescue the splicing defect and recover exon 20 skipping, we investigated a novel class of U1 snRNAs molecules, exon-specific U1s (ExSpeU1s), designed to target intronic sequences downstream the 5'ss. In an in vitro minigene model system and in FD primary fibroblasts, ExSpeU1-ELP1 promoted complete inclusion of the defective exon. To test this approach in vivo we performed systemic and intra cerebro ventricular injections of AAV ExSpeU1-ELP1 in an asymptomatic transgenic FD mouse model that recapitulate the human splicing defect. Interestingly, this delivery systems corrects splicing and protein defects in several tissues including those more affected by the disease (Brain, Dorsal Root Ganglia and Trigemium). The efficacy of ExSpeU1-ELP1 as a novel FD therapeutic treatment will be now tested in a novel symptomatic mouse model that does have both mis-splicing and FD symptoms.

### SVILUPPO DI UNA TERAPIA BASATA SUGLI EXON SPECIFIC U1 NELLA DISAUTONOMIA FAMILIARE

Lo scopo principale del progetto è quello di sviluppare una terapia innovativa basata su piccole molecole di RNA per il trattamento della Disautonomia Familiare, una grave malattia rara. I pazienti con Disautonomia Familiare sviluppano dei difetti nei neuroni sensitivi con sintomi cardiaci (instabilità cardiaca e bassa pressione sanguigna) e sintomi a carico dell'apparato gastrointestinale e polmonare (polmonite). Inoltre I pazienti perdono anche la capacità di percepire il dolore e sviluppano una atrofia progressiva del nervo ottico con perdita della vista dalla prima decade di vita. Non più del 50% dei pazienti raggiunge l'età di 30 anni e non esistono trattamenti curativi. Nei pazienti affetti da Disautonomia Familiare, il difetto genetico produce un RNA alterato (a causa di un cosiddetto difetto di splicing). Negli ultimi anni, studiando come viene prodotto questo RNA alterato, abbiamo scoperto una piccola molecola di RNA terapeutica. Questo piccolo RNA è normalmente presente nelle nostre cellule ma può essere modificato per correggere in modo specifico il difetto di base presente nella Disautonomia Familiare. In questo progetto sono stati identificate delle molecole attive in diversi modelli. Tali molecole attraverso dei vettori virali (AAV) vengono correttamente indirizzate nei tessuti bersaglio ed in particolare nei neuroni sensitivi. Tali evidenze verranno confermate in modelli di malattia più complessi.

Donadon, I., Pinotti, M., Rajkowska, K., Pianigiani, G., Barbon, E., Morini, E., Motaln, H., Rogelj, B., Mingozzi, F., Slaugenhaupt, S.A. et al. (2018) Exon-specific U1 snRNAs improve ELP1 exon 20 definition and rescue ELP1 protein expression in a familial dysautonomia mouse model. Hum Mol

Genet, 27, 2466-2476.

Donadon, I., Bussani, E., Riccardi, F., Licastro, D., Romano, G., Pianigiani, G., Pinotti, M., Konstantinova, P., Evers, M., Lin, S. et al. (2019) Rescue of spinal muscular atrophy mouse models with AAV9-Exon-specific U1 snRNA. *Nucleic Acids Res*, 47, 7618-7632.

Rogalska, M.E., Tajnik, M., Licastro, D., Bussani, E., Camparini, L., Mattioli, C. and Pagani, F. (2016) Therapeutic activity of modified U1 core spliceosomal particles. *Nat Commun*, 7, 11168.

Disautonomia Familiare

Coordinator: Franco Pagani

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17006

**Disease Name:**

Familial Dysautonomia

**Keywords:**

FAMILIAL DYSAUTONOMIA, Splicing Defects, Adeno Associates Virus

## Poster P.10.67

### FATAL FAMILIAL INSOMNIA: PREVENTIVE TREATMENT WITH DOXYCYCLINE OF AT RISK INDIVIDUALS

Forloni G.<sup>[1]</sup>, Tettamanti M.<sup>[1]</sup>, Lucca U.<sup>[1]</sup>, Chiesa R.<sup>[1]</sup>, Albanese Y.<sup>[1]</sup>, Redaelli V.<sup>[2]</sup>, Tagliavini F.<sup>[2]</sup>, Artuso V.<sup>[3]</sup>, Roiter I.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Neuroscience IRCCS, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Fondazione IRCCS - Istituto Neurologico "Carlo Besta" ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>Dept. of Internal Medicine, Medicine Operative Unit Oderzo ASL 9 ~ Treviso ~ Italy

Fatal Familial Insomnia (FFI) is inherited disease in an autosomal dominant fashion and is linked to the aspartic acid to asparagine mutation at codon 178 of the prion protein gene in association with a methionine at the polymorphic codon 129 (D178N/M129). FFI is a rare genetic neurodegenerative disease characterized by disrupted sleep, autonomic hyperactivation and motor abnormalities. The disease is devastating and usually the patients die within two years from the onset and no treatments are available. In this project we propose to carry out a preclinical treatment with doxycycline (DOXY) in subjects with a genetic risk to develop FFI. Eighty-five members of the large FFI family were genotyped for the D178N mutation and 22 of them were found to carry the mutation. Based on the analysis of the previous cases (38 subjects) we determined within the range of 50-55 years of age the life period with highest risk to develop FFI. Since the penetrance is very high and the possibility to cure the disease after the clinical onset is remote, we propose a preventive treatment with DOXY to the carriers that were born between 1958 and 1969. The potential efficacy of DOXY in prion diseases derived from experimental investigations and two clinical observational studies in Italy and Germany with positive effects on survival and negligible side effects. A more recent double blind trial did not support the use of DOXY in CJD subjects with overt clinical disease, this underscores the need to develop a preventive approach in a pathological condition that, when full-blown, leaves little possibility of cure with a drug treatment. Thus, we treated 10 carriers receiving DOXY (100 mg/die orally) within a trial where other 15 non carrier subjects belong to the same families were recruited and treated with placebo to maintain blind the genotype of the treated subjects. This was specifically requested by the participants at the study. Before starting the treatment and every second year afterward, all the 25 individuals were clinically examined. Although the size of the sample is limited, according to the statistical analysis we will be able within 10 years to establish the efficacy of the treatment. This would be the first preventive study in FFI, which takes advantage of the unique opportunity to treat in a controlled condition a large pedigree of individuals at risk of developing the disease. Three subject carriers that at the beginning expressed their willingness to participate at the study, at the moment of formal recruitment they refused to be involved. The replacement of these subjects with members of the family living outside of the Treviso area, having less contact with the original group, took us some time. The final number of the recruited carriers was 10 instead of 11 with minimal consequence on the power of the study. Furthermore, the presence of carriers belonging to the family which did not receive the treatment with DOXY can be a useful contribution to the study because they can be considered as an external control group. The second follow up, four years after the starting treatment has been completed. Furthermore in all subjects studied it has been performed a nasal brushing to identify the presence of pathological prion protein (PrPres) by a sensitive method based on PrPres amplification, the analysis has been repeated after one year. More recently it has been activated a international collaboration to collect plasma samples in members of families with genetic forms of TSE. In this

samples it has been investigated the presence of antibodies against prion protein to develop possible therapeutic tools.

Insonnia Fatale Familiare: trattamento preventivo con doxiciclina in soggetti a rischio genetico di malattia.

L'insonnia fatale familiare (FFI) è una malattia genetica neurodegenerativa caratterizzata da disturbo del sonno, iperattivazione del sistema autonomico e anomalie motorie. FFI appartiene al gruppo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) dette anche malattie da prioni. Le TSE sono malattie neurodegenerative trasmissibili caratterizzate da un fenotipo molto eterogeneo, i casi genetici sono associati a mutazioni sul gene che codifica per la proteina prion. FFI è una malattia autosomica dominante associata alla mutazione da acido aspartico ad asparagina sul codone 178 del gene prion in combinazione con la presenza di metionina sul codone polimorfico 129 (D178/M129). La malattia è devastante e normalmente porta a morte in meno di due anni, non ci sono ad oggi trattamenti efficaci. In questo progetto ci proponiamo di effettuare un trattamento preclinico con doxiciclina (DOXY) in soggetti a rischio genetico di sviluppare FFI. La potenziale efficacia della DOXY nelle TSE deriva da numerosi studi sperimentali e da due studi clinici osservazionali che in Italia e in Germania hanno dimostrato effetti positivi con questo farmaco nelle TSE e un'ottima tollerabilità. In uno studio più recente la DOXY è stata testata in un trial randomizzato contro placebo in soggetti con CJD conclamato e l'effetto positivo non è stato confermato. Quest'ultimi dati confermano la necessità di studi preventivi che consentano al farmaco di svolgere con efficacia il suo effetto. Sono stati genotipizzati 85 soggetti appartenenti ad una famiglia con membri affetti da FFI, 22 di questi sono risultati portatori della mutazione D178/M129. Sulla base dell'analisi storica della mortalità nei soggetti FFI appartenenti a questa famiglia (38 casi) è stato possibile stabilire che l'età più a rischio di sviluppare la patologia è fra i 50 e i 55 anni. Sulla base dell'età 10 soggetti portatori della mutazione ricevono DOXY (100 mg/die) sono inseriti in uno studio che prevede il trattamento con il placebo per 15 familiari non portatori. Questo disegno è stato espressamente richiesto per non svelare il genotipo dei soggetti partecipanti. Prima di iniziare il trattamento e ogni due anni tutti e 25 soggetti sono sottoposti ad un'analisi clinica approfondita per stabilire il loro stato di salute in relazione alla FFI. Sebbene le dimensioni del campione siano limitate, l'analisi statistica ci consentirà nell'arco di dieci anni di valutare l'efficacia del trattamento. Questo è il primo studio preventivo nella FFI che è reso possibile dalla possibilità unica di trattare, in condizioni controllate, un numero sufficientemente ampio di soggetti a rischio di sviluppare la malattia appartenenti alla stessa famiglia. Al momento della sottoscrizione del consenso informato alcuni soggetti che pure avevano dato la loro disponibilità hanno deciso di non partecipare allo studio. La sostituzione di questi soggetti ha richiesto un ulteriore sforzo per il reclutamento di appartenenti alla famiglia ma esterni al nucleo iniziale di Treviso. Il numero finale di soggetti trattati è quindi sceso a 10 invece che 11 con un effetto modesto sulla potenza dello studio. Inoltre la presenza di soggetti portatori della mutazione che non ricevono DOXY può configurarsi come un gruppo di controllo esterno. Nel giugno 2012, il primo soggetto reclutato ha concluso le visite cliniche e neurologiche e ha iniziato il trattamento, attualmente il secondo follow up a quattro anni si è concluso. Inoltre in tutti i soggetti studiati è stata fatta un'analisi della presenza di proteina prion patologica in cellule epiteliali della mucosa olfattiva ottenute da un prelievo nasale (brushing), con un metodo molto sensibile, basato sull'amplificazione della proteina patologica, l'analisi è stata ripetuta a distanza di un anno. Più recentemente è stata attivata una collaborazione internazionale per la raccolta di campioni plasmatici in soggetti appartenenti a famiglie con forme genetiche di TSE. In questi campioni viene analizzata la presenza di possibili anticorpi contro la proteina prionica per sviluppare potenziali strumenti terapeutici

Insomnia Familiare Fatale

Coordinator: Gianluigi Forloni

Partners: Benedetto Ignazio Roiter, Fabrizio Tagliavini

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GSP18001

**Disease Name:**

Fatal Familial Insomnia

**Keywords:**

Fatal familial insomnia, doxycycline, clinical trial

## Poster P.10.68

### NEUROSERPIN MISFOLDING AND FENIB NEURODEGENERATION: MECHANISM AND INHIBITION PROCESSES

Visentin C.\*<sup>[1]</sup>, Broggin L.<sup>[1]</sup>, Russo R.<sup>[2]</sup>, Bonato F.<sup>[3]</sup>, Passarella D.<sup>[3]</sup>, Dallavalle S.<sup>[4]</sup>, Manno M.<sup>[5]</sup>, Bolognesi M.<sup>[1]</sup>, Ricagno S.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[4]</sup>Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[5]</sup>Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche ~ Palermo ~ Italy

Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies (FENIB) is a rare and genetic disease characterized by progressive neurodegeneration and dementia [1]. The onset of the pathology is accounted to the impact of specific point mutations in neuroserpin (NS) protein folding. Mutated NS polymerises and accumulates as inclusion bodies within endoplasmatic reticulum of neurons [2]. Wild type NS presents two glycosylation sites, N157 and N321, but their role in NS pathological behaviour is not elucidated in vitro [3].

We recombinantly expressed for the first time glycosylated NS using LEXSY expression system. The presence of the glycosylation was confirmed by mass spectroscopy. The native fold of protein was demonstrated by circular dichroism analysis and the activity test supports this data highlighting a higher rate of tPA inhibition if compared to non-glycosylated NS. Moreover, in vitro polymerization test supports the protective role of the post-translational modifications.

We previously reported the capability of embelin (EMB) to interfere with NS polymerisation [4]. Unfortunately this compound is unsuitable for therapeutic purpose because of its poor solubility and high cellular toxicity. We then synthesised and screened several EMB-like compounds to identify the active portion of the molecule. In particular, we tested compounds with modifications on the quinonic ring or the length of the aliphatic tail.

L'encefalopatia con corpi di inclusione di neuroserpina è una rara malattia genetica caratterizzata da neurodegenerazione progressiva e conseguente demenza [1]. L'insorgenza della malattia è associata a mutazioni puntiformi nel gene di neuroserpina (NS) che causano alterazioni nel folding della proteina. Infatti, i mutanti polimerizzano e si accumulano nel reticolo endoplasmatico dei neuroni sotto forma di corpi di inclusione [2]. NS presenta due siti di glicosilazione, N157 e N321, ma il loro ruolo nella patogenesi non è ancora stato chiarito [3].

Riportiamo per la prima volta l'espressione di NS ricombinate e glicosilate, ottenuta utilizzando LEXSY come sistema di espressione. La presenza della glicosilazione è stata confermata attraverso analisi di spettrometria di massa, mentre con analisi di dicroismo circolare abbiamo verificato il corretto folding della proteina. Il test di attività in vitro ha evidenziato una maggior inibizione del tPA da parte di NS glicosilata rispetto alla variante non glicosilata. In presenza della modificazione post-traduzionale inoltre abbiamo osservato un rallentamento della cinetica di polimerizzazione in vitro.

In un precedente lavoro abbiamo riportato la capacità di embelina (EMB) di inibire la polimerizzazione di NS [4], ma la scarsa solubilità e l'elevata citotossicità di questo composto lo rendono poco adatto ad applicazioni terapeutiche. Abbiamo quindi sintetizzato e testato diversi composti derivati da EMB al fine di identificarne la porzione attiva. In particolare abbiamo modificato l'anello chinonico e la



lunghezza della coda alifatica.

[1] Davis RL, et al. (1999) Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. Nature 401(6751):376-379<sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>

[2] Gooptu B & Lomas DA (2009) Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. Annual review of biochemistry 78:147-176.

[3] Moriconi C, et al. (2015) Interactions between N-linked glycosylation and polymerisation of neuroserpin within the endoplasmic reticulum. FEBS J.

[4] Saga G, et al. (2016) Embelin binds to human neuroserpin and impairs its polymerisation. Sci Rep 6:18769<sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>

Encefalopatia familiare con corpi di inclusione di neuroserpina

Coordinator: Martino Bolognesi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17036

**Disease Name:**

FENIB

**Keywords:**

Neurodegeneration, Neuroserpin, Embelin

## Poster P.10.69

### LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS (LSD) - MODELING THE DISEASE COMPLEXITY TO REFINE GENE/CELL THERAPY TREATMENT STRATEGIES

Ricca A.<sup>[1]</sup>, Ornaghi F.<sup>[1]</sup>, Mangiameli E.<sup>[1]</sup>, Luciani M.<sup>[1]</sup>, Cascino F.<sup>[1]</sup>, Sala D.<sup>[1]</sup>, Tiradani L.<sup>[1]</sup>, Cecchele A.<sup>[1]</sup>, Morena F.<sup>[2]</sup>, Martino S.<sup>[2]</sup>, Gritti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>1. *San Raffaele Scientific Institute, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ Milano ~ Italy,*

<sup>[2]</sup>*University of Perugia ~ Perugia ~ Italy*

Lysosomal storage disorders (LSD) are a heterogeneous group of inherited diseases with a collective frequency of ~1 in 7,000 births, resulting from the deficiency in one or more lysosomal proteins. Pathology results from the progressive accumulation of uncleaved substrates and secondary damage that affect the central nervous system (CNS; in >70% of LSD), peripheral nervous system (PNS) and periphery. Defects in the lysosomal enzymes arylsulfatase A (ARSA),  $\beta$ -galactocerebrosidase (GALC) and N-acetyl hexosaminidase (Hex) lead to MLD, GLD, and GM2 gangliosidosis, respectively. Our previous and current studies aim to study the mechanisms of disease pathogenesis and develop novel gene therapy (GT) approaches for these LSD that despite the shared multi-organ pathology display unique features, likely translating in different treatment requirements and/or different outcome of a given treatment. Based on promising pre-clinical and clinical data showing the therapeutic potential of GT in LSD (1–5), it is expected that combinatorial strategies addressing the complex LSD pathology and ensuring appropriate timing of intervention would become of increasing interest in the perspective of clinical translation (6). Our long-term goal is to enhance and complement the unique treatment modality provided by GT (i.e. the advantages of enzyme overexpression and widespread biodistribution) to develop innovative and safer therapeutic strategies that could address comprehensively the pathology of LSD that still lack effective curative options. To this end, a better understanding of the early pathogenic events and of the mechanisms of disease correction upon treatments (e.g. enzyme availability in affected tissues) is required. In this project, we extensively address these issues that have been only partially elucidated. We take advantage of relevant murine and human in vitro systems, including iPSC-derived 2D/3D cultures (7,8) and hematopoietic-derived cells coupled to -OMICS platforms (lipidomics, proteomics, genomics), lentiviral-mediated GT platforms, and relevant LSD animal models. Besides expanding our knowledge of GLD, MLD, and GM2-gangliosidosis pathogenesis, this work will provide insights into the biological process of lysosomal enzyme trafficking and secretion, key processes to ensure metabolic cross-correction of affected cells and tissues. Importantly, the proposed research project will exploit this knowledge to develop innovative GT approaches. We will report data obtained during the first three years of funding.

Malattie da accumulo lisosomiale – modellare la complessità della malattia per affinare strategie di terapia genica e cellulare

Le malattie da accumulo lisosomiale (LSD) sono un gruppo eterogeneo di condizioni genetiche con frequenza cumulativa di ~1 in 7,000 nascite, causate da deficit di uno o più enzimi lisosomiali e/o trasportatori. La patologia deriva da un progressivo accumulo di substrati non degradati e da danni secondari che colpiscono il sistema nervoso centrale e periferico, e altri organi. La mancanza di arilsufatasi A (ARSA), beta-galattocerebrosidasi (GALC) e N-acetyl hexosaminidase (Hex) causa la leucodistrofia metacromatica (MLD), la leucodistrofia a cellule globoidi (GLD) e la GM2 gangliosidosi,

rispettivamente. I nostri studi precedenti e quelli in corso hanno l'obiettivo di studiare i meccanismi di patologia e sviluppare nuove strategie di terapie genica per queste malattie che, pur avendo delle caratteristiche comuni, presentano molti tratti distintivi che potrebbero richiedere differenti trattamenti e/o portare a differenti risultati a seguito dello stesso trattamento. Sulla base di promettenti risultati ottenuti in studi pre-clinici utilizzando piattaforme di terapia genica con vettori lentivirali (1–5), ci attendiamo che terapie combinate in grado di affrontare la complessità della patologia di queste malattie diventeranno di grande interesse per la futura traslazione clinica (6). Il nostro obiettivo a lungo termine è incrementare e complementare la peculiare modalità di trattamento rappresentata dalla terapia genica (es. espressione sovrafisiologica e distribuzione delle molecole terapeutiche) per sviluppare strategie terapeutiche innovative e sicure per le LSD severe che ancora non hanno un trattamento disponibile e/o efficace. A questo scopo, è necessario conoscere meglio i meccanismi patogenetici e i meccanismi alla base dell'effetto terapeutico di un determinato trattamento. In questo progetto affronteremo in modo dettagliato questi argomenti che a oggi sono stati solo parzialmente elucidati. A questo scopo, utilizzeremo modelli di malattia murini e umani, che includono colture 2D/3D derivate da cellule staminali pluripotenti umane paziente specifiche (7,8) e cellule di origine ematopoietica, accoppiati a piattaforme di terapia genica con vettori lentivirali e tecnologie di –OMICA (lipidomica, proteomica, genomica). Oltre ad accrescere la nostra conoscenza della patogenesi di GLD, MLD, e GM2-gangliosidosi, i risultati di questo lavoro consentiranno di approfondire la conoscenza di importanti processi biologici quali i meccanismi di traffico degli enzimi lisosomiali, che sono alla base della correzione metabolica dei tessuti affetti da LSD. Infine, questo progetto si propone di utilizzare queste conoscenze per sviluppare approcci innovativi di terapia genica. Descriveremo i dati ottenuti nel corso dei primi tre anni di finanziamento.

1. Lattanzi, A. et al. Therapeutic benefit of lentiviral-mediated neonatal intracerebral gene therapy in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3250–3268 (2014).
2. Meneghini, V. et al. Pervasive supply of therapeutic lysosomal enzymes in the CNS of normal and Krabbe-affected non-human primates by intracerebral lentiviral gene therapy. *EMBO Mol. Med.* 8, 489–510 (2016).
3. Lattanzi, A. et al. Widespread enzymatic correction of CNS tissues by a single intracerebral injection of therapeutic lentiviral vector in leukodystrophy mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2208–2227 (2010).
4. Ricca, A. et al. Combined gene/cell therapies provide long-term and pervasive rescue of multiple pathological symptoms in a murine model of globoid cell leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* pii: ddv08, 3372–3389 (2015).
5. Meneghini, V. et al. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Bona Fide Neural Stem Cells for Ex Vivo Gene Therapy of Metachromatic Leukodystrophy. *Stem Cells Transl. Med.* 1–17 (2016). doi:10.5966/sctm.2015-0414
6. Ricca, A. & Gritti, A. Perspective on innovative therapies for globoid cell leukodystrophy. *Journal of Neuroscience Research* 94, 1304–1317 (2016).
7. Frati, G. et al. Human iPSC-based models highlight defective glial and neuronal differentiation from neural progenitor cells in metachromatic leukodystrophy. *Cell Death Dis.* (2018). doi:10.1038/s41419-018-0737-0
8. Mazzara, P. G. et al. Two factor-based reprogramming of rodent and human fibroblasts into Schwann cells. *Nat. Commun.* 8, (2017).

GLD, MLD, GM2 Gangliosidosi

Coordinator: Angela Gritti

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16D02

**Disease Name:**

GLD, MLD, GM2 Gangliosidosis

**Keywords:**

Gene therapy, neural stem cells, pluripotent stem cells

## Poster P.10.70

### **MENINGES AS AN OVERLOOKED PHARMACOLOGICAL TARGET FOR GLOBOID CELL LEUKODYSTROPHY**

Mattioli M.<sup>[3]</sup>, Riva M.<sup>[1]</sup>, Gritti A.<sup>[2]</sup>, Bifari F.<sup>\*[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Unit of Oncological Neurosurgery Humanitas Research Hospital; Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Gene/neural stem cell therapy for lysosomal storage diseases San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Laboratory of Cell Metabolism and Regenerative Medicine; Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine; University of Milan ~ Milan ~ Italy

Globoid cell Leukodystrophy Disease (GLD) is an autosomal recessive disease caused by genetic defects in the lysosomal enzyme galactosylceramidase (GALC). It is a severe neurodegenerative life-threatening disease that manifests early in life (3 months to 6 years) with rapid progression (within 2 years). There is no cure for GLD.

Treatment options are still very poor. Enzyme reconstitution by protein or gene therapy (GT) provides variable results. However, early onset GLD remains a devastating disease with poor prognosis.

In this Telethon Project, we will consider GLD pathogenesis and therapy from an entirely new angle. We will study GLD neurodegeneration and therapy by changing the focus from the neurons and oligodendrocytes to the non-parenchymal brain cells. In particular, we will study the involvement of meninges in GLD pathogenesis and progression. Meninges are highly heterogeneous tissue with trophic, immune and neurogenic properties. Meninges are: - widely distributed into the brain; - a gateway for immune cell access into the CNS and - important source of trophic factors for the brain. Recently, we have identified neural progenitor cell (NPC) population in meninges that migrate to the cortex and differentiate into functional and integrated cortical neurons (Bifari et al Cell Stem Cell 2017).

In this project, we will assess GLD-induced activation of meninges and meningeal NPCs. We will exploit meninges as effective complementary site for GALC gene transfer in GLD. Transduced meningeal cells may provide GALC secretion to the brain (cross-correction) and GALC-transduced meningeal NPCs can migrate to the brain and differentiate into GALC-overexpressing cortical neurons. Furthermore, we can culture, from adult human meninges, NPCs with neuronal differentiation potential. We will perform proof of concept of efficacy and safety of supra-physiological GALC expression in somatic, human meningeal NPCs (as potential therapeutic target for meningeal-directed in vivo GT).

La Malattia di Krebbe è una malattia genetica estremamente grave ed invalidante causata dall'assenza del gene GALC, che provoca la degenerazione delle cellule neurali del cervello. Attualmente, i tentativi di ripristinare i livelli dell'espressione di questo gene mancante non sono totalmente efficaci.

In questo progetto Telethon, il Dott. Francesco Bifari, responsabile del progetto del Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale (BIOMETRA) insieme alla Dott.ssa Angela Gritti, direttrice dell'Unità di Gene Therapy per la Leucodistrofia dell'ospedale San Raffaele, SR-Tiget e al neurochirurgo Dott. Marco Riva, BIOMETRA, propongono di valutare la Malattia di Krebbe da un nuovo punto di vista.

Valuteranno l'efficacia della correzione genica delle cellule che formano le meningi (membrane che

avvolgono l'encefalo). Queste diventeranno quindi bioreattori capaci di esprimere il gene GALC e produrre la proteina che viene distribuita alle cellule neurali tramite il flusso di liquor che bagna e nutre il cervello.

1. Wenger DA, Rafi MA, Luzi P: Molecular genetics of Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): diagnostic and clinical implications. *Hum Mutat* 1997, 10(4):268-279.
2. Lattanzi A, Neri M, Maderna C, di Girolamo I, Martino S, Orlacchio A, Amendola M, Naldini L, Gritti A: Widespread enzymatic correction of CNS tissues by a single intracerebral injection of therapeutic lentiviral vector in leukodystrophy mouse models. *Hum Mol Genet* 2010, 19(11):2208-2227.
3. Bifari F, Decimo I, et al: Neurogenic Radial Glia-like Cells in Meninges Migrate and Differentiate into Functionally Integrated Neurons in the Neonatal Cortex. *Cell Stem Cell* 2017, 20(3):360-373 e367.
4. Pino A, Fumagalli G, Bifari F, Decimo I: New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies. *Biochem Pharmacol* 2017, 141:4-22.
5. Iliff JJ, et al: A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 2012, 4(147):147ra111.
6. Sessa M, et al: Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 2016, 388(10043):476-487.

Malattia di Krebbe

Coordinator: Francesco Bifari  
Partners: Angela Gritti, Marco Riva  
Duration (N. Years): 2  
Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19250

**Disease Name:**

Globoid Cell Leukodystrophy

**Keywords:**

Globoid Cell Leukodystrophy, Gene Therapy, Meninges

## Poster P.10.71

### PLASMALOGEN-BASED THERAPEUTIC STRATEGY FOR THE TREATMENT OF HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA

Mattarei A.<sup>[1]</sup>, Daga A.<sup>[3]</sup>, Vedovelli L.<sup>[2]</sup>, Pendin D.\*<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>Dept of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Sciences ~ Padova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Scientific Institute IRCCS E. Medea ~ Padova ~ Italy, <sup>[4]</sup>Neuroscience Institute - CNR ~ Padova ~ Italy

Hereditary Spastic Paraplegias (HSPs) are inherited neurologic disorders characterized by high genetic heterogeneity. Nevertheless, alterations in morphology or distribution of the endoplasmic reticulum (ER) appears to be a critical pathogenic factor [1]. Recently, a novel mutation in EPT1 gene, encoding a crucial enzyme in the biosynthesis of plasmalogens (PLs), was identified in HSP patients [2]. PLs are ether phospholipids abundant in ER membranes. Ethanolamine-based PLs (PE-PLs) are enriched in nervous system membranes, constituting up to 85 mol% of total phosphatidylethanolamine (PE) species and up to 30 mol% of total phospholipids in mammalian brains. Notably, PLs amount was found decreased in several neurological diseases, suggesting that PLs could play a role in neuronal membranes welfare. PE-PLs are suggested to promote the formation of inverted hexagonal phases [3], thus facilitating membrane fusion events [4], however, the sub-molecular details behind the above properties are not fully understood. By exploiting in vitro, in situ and in vivo HSP models, we aim at identifying a potential role for PLs in the remodeling of ER membranes in neurons. Our hypothesis is that manipulating ER membrane lipid composition in a way that favors membrane dynamics, we could rescue HSP-related ER morphology defects. The validated approach could prove a new therapeutic option for HSPs and potentially for other neurodegenerative diseases involving phospholipids-related membrane impairment.

Le Paraplegie Spastiche Ereditarie sono un gruppo di disordini neurologici ereditari caratterizzati da elevata eterogeneità a livello genetico. Ciononostante, alterazioni nella morfologia e distribuzione del Reticolo Endoplasmatico (RE) appaiono come un fattore critico nella patogenesi del disordine. Recentemente è stata identificata nei pazienti una nuova mutazione nel gene EPT1, che codifica per un enzima cruciale nella biosintesi dei plasmalogeni (PL). I PL sono fosfolipidi abbondanti nel RE ed in generale nelle membrane che compongono il sistema nervoso. Sebbene sia stato suggerito che una classe di PL abbia un ruolo nel rimodellamento delle membrane biologiche, la loro funzione specifica non è ancora stata chiarita. Ridotti livelli di PL sono stati osservati in pazienti affetti da altri disordini neurologici; questo suggerisce che i PL potrebbero ricoprire un ruolo fondamentale nel mantenimento della funzionalità neuronale. Sfruttando i modelli di Paraplegia Spastica Ereditaria che abbiamo a disposizione, il progetto si propone di identificare un nuovo ruolo dei PL nel rimodellamento delle membrane del RE nei neuroni. La nostra ipotesi è che la manipolazione della composizione lipidica delle membrane del RE, possa recuperare i difetti nella struttura del RE riscontrati nelle Paraplegie Spastiche Ereditarie, fornendo quindi una potenziale nuova via terapeutica.

[1] Blackstone C. 2018. Converging cellular themes for the hereditary spastic paraplegias. *Curr Opin Neurobiol* 51:139–146.

[2] Horibata Y, Elpeleg O, Eran A, Hirabayashi Y, Savitzki D, Tal G, Mandel H, Sugimoto H. 2018.

Ethanolamine phosphotransferase 1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in human. *J. Lipid Res* 59(6):1015-1026.

[3] Lohner K, Hermetter A, Paltauf F. 1984. Phase behavior of ethanolamine plasmalogen. *Chem. Phys. Lipids* 34:163–170.

[4] Glaser PE, Gross RW. 1994. Plasménylethanolamine Facilitates Rapid Membrane Fusion: A Stopped-Flow Kinetic Investigation Correlating the Propensity of a Major Plasma Membrane Constituent To Adopt an HII Phase with Its Ability To Promote Membrane Fusion. *Biochemistry* 33:5805–5812.

Paraplegia Spastica Ereditaria

Coordinator: Diana Pendin

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19304

**Disease Name:**

Hereditary Spastic Paraplegia

**Keywords:**

Hereditary Spastic Paraplegia, Plasmalogens, Endoplasmic Reticulum



## Poster P.10.72

### SLUGGISH MITOCHONDRIAL FLICKERING AT THE BASIS OF HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA (SPG7)

Sambri I.<sup>[1]</sup>, Massa F.<sup>[1]</sup>, Gullo F.<sup>[2]</sup>, Meneghini S.<sup>[2]</sup>, Cassina L.<sup>[3]</sup>, Patanella L.<sup>[1]</sup>, Santorelli F.<sup>[4]</sup>, Codazzi F.<sup>[5]</sup>, Grohovaz F.<sup>[5]</sup>, Bernardi P.<sup>[6]</sup>, Becchetti A.<sup>[2]</sup>, Casari G.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetica and Medicine ~ Naples ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Milano-Bicocca ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[4]</sup>Fondazione Stella Maris ~ Pisa ~ Italy, <sup>[5]</sup>Università Vita-Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[6]</sup>University of Padova ~ Padova ~ Italy

Corticospinal tract degeneration is the cardinal feature of hereditary spastic paraplegia (HSP), a large group of rare genetic neurological diseases characterized by lower limb spasticity and weakness. Mutation in the SPG7 gene, which encodes the mitochondrial protein paraplegin, cause HSP type 7 (SPG7). Mitochondria play a key role in determining the cell fate during stress condition, through the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), a non-selective channel that opens at high or low conductance mode. High conductance opening leads to cell death programs, conversely, intermittent fast opening and closing of the pore is essential for mitochondrial homeostasis, as it allows to effectively reduce intra-matrix concentration of Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species (ROS).

Moreover, mitochondria homeostasis at the synapse is tightly regulated by mPTP gating as neurons experience high metabolic demand during processes such as synaptic vesicle recycling, membrane potential maintenance, and Ca<sup>2+</sup> exchange/extrusion. We assessed calcium retention capacity (CRC) on Spg7 KO HEK293 cells and found a consistent increase of CRC, thus indicating that the absence of paraplegin does modulate the regulation of mPTP opening. This condition has been further characterized in fibroblasts carrying different SPG7 mutations using TMRM dye for quantitative spatiotemporal analysis of reversible mPTP openings in living cells. SPG7 mutants and paraplegin-null cells display rare opening events compared to controls. SPG7 impaired flickering is rescued to normal by re-expressing paraplegin (transfection of SPG7-IRES-GFP).

Interestingly, fibroblasts deriving from other types of non-SPG7 HSP show normal mPTP opening frequency and amplitude, confirming the paraplegin specific regulatory activity on mPTP modulation. Since Ca<sup>2+</sup> released from mitochondria regulates synaptic plasticity, mPTP alterations in neurons could be detrimental for synaptic transmission. We found indeed mPTP impairment also in Spg7<sup>-/-</sup> cortical neurons compare to wild-type and defects in synaptic transmission measured by synaptic vesicle recycling assay, patch-clamp and Multi Electrode Array (MEA). These results demonstrate a pivotal role of paraplegin in mPTP modulation that have important consequences in terms of mechanism of disease and, importantly, for designing an original therapeutic intervention for SPG7-HSP.

L'alterata apertura del canale di membrana mitocondriale (mPTP) è alla base della paraplegia spastica ereditaria di tipo 7 (SPG7)

La degenerazione del tratto corticospinale è la principale caratteristica della paraplegia spastica ereditaria (HSP), un folto gruppo di malattie genetiche rare con coinvolgimento neurologico e caratterizzate da spasticità e debolezza degli arti inferiori. La mutazione nel gene SPG7, che codifica per la proteina mitocondriale paraplegina, causa HSP di tipo 7 (SPG7). I mitocondri svolgono un ruolo chiave nel determinare il destino delle cellule in condizioni di stress, attraverso il poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP), un canale non selettivo che si apre in modalità di alta o

bassa conduttanza. L'apertura ad alta conduttanza porta a programmi di morte cellulare, al contrario, la rapida apertura e chiusura intermittente del poro (flickering) è essenziale per l'omeostasi mitocondriale, poiché consente di ridurre efficacemente la concentrazione intra-matrice di  $\text{Ca}^{2+}$  e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In questo lavoro abbiamo valutato la capacità di ritenzione del calcio mitocondriale (CRC) in cellule HEK293 Spg7 KO e abbiamo riscontrato un consistente aumento di tale capacità che indica che l'assenza di paraplegina ha un ruolo chiave nella regolazione dell'apertura dell'mPTP. Questa modulazione è stata ulteriormente caratterizzata nei fibroblasti con diverse mutazioni nel gene SPG7 mediante l'utilizzo del colorante TMRM che permette l'analisi spazio-temporale quantitativa delle aperture reversibili dell'mPTP in cellule viventi. Le cellule mutate in SPG7 mostrano eventi di apertura dell'mPTP più rari rispetto alle cellule controllo. L'alterato flickering in SPG7 viene riportato alla normalità riesprimendo la paraplegina (trasfezione di SPG7-IRES-GFP). È interessante notare che i fibroblasti derivanti da altri tipi di HSP non SPG7 mostrano una normale frequenza e ampiezza di apertura dell'mPTP, confermando la specifica attività della paraplegina nella modulazione dell'mPTP. Poiché il  $\text{Ca}^{2+}$  rilasciato dai mitocondri regola la plasticità sinaptica le alterazioni dell'mPTP nei neuroni potrebbero essere dannose per la trasmissione sinaptica. Abbiamo infatti riscontrato un difetto di flickering dell'mPTP anche nei neuroni corticali Spg7<sup>-/-</sup> rispetto ai neuroni controllo, nonché difetti nella trasmissione sinaptica misurati attraverso saggio di misura del riciclo delle vescicole sinaptiche, patch-clamp e Multi Electrode Array (MEA). Nel loro complesso questi risultati dimostrano un ruolo fondamentale della paraplegina nella modulazione dell'mPTP che ha importanti conseguenze in termini di meccanismo d'azione della malattia e, soprattutto, per lo sviluppo di un innovativo intervento terapeutico per SPG7-HSP.

Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Dürr A, Fontaine B, Ballabio A. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*. 1998 Jun 12;93(6):973-83.

Paraplegia Spastica Ereditaria (SPG7)

Coordinator: Giorgio Casari

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Hereditary Spastic Paraplegia Type 7 (SPG7)

**Keywords:**

mitochondria, permeability transition pore, synapse

## Poster P.10.73

### TARGETING NEURONS WITH CHOLESTEROL. HOW CAN IT CHANGE THE FUTURE OF HD PATIENTS

Cattaneo E.<sup>[1]</sup>, Valenza M.<sup>[1]</sup>, Birolini G.<sup>[1]</sup>, Tosi G.<sup>[2]</sup>, Pederzoli F.<sup>[2]</sup>, Ruozi B.<sup>[2]</sup>, Passoni A.<sup>[3]</sup>, Bagnati R.<sup>[3]</sup>, Salmona M.<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Biosciences and Centre for Stem Cell Research, University of Milan, Milan, Italy and Istituto Nazionale di Genetica Molecolare "Romeo ed Enrica Invernizzi", Milan (Italy) ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Nanomedicine and Pharmaceutical technology, Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena (Italy) ~ Modena ~ Italy, <sup>[3]</sup>Department of Environmental Health Sciences, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" IRCCS, Milan (Italy) ~ Milan ~ Italy, <sup>[4]</sup>Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" IRCCS, Milan ~ Milano ~ Italy

Numerous studies demonstrated that brain cholesterol (chol) biosynthesis is reduced in several Huntington's disease (HD) mouse models since pre-symptomatic stages of the disease, leading to decreased brain chol content which may affect neuronal activity.

Our previous studies indicate that the delivery of 20µg of cholesterol into the brain of HD mice via brain-permeable polymeric nanoparticles (Chol-g7-NPs) ameliorates cognitive defects (Valenza et al., 2015). Next we worked to identify the dose of chol able to rescue both cognitive and motor phenotypes. To this aim we used osmotic-minipumps to obtain continuous, defined and constant release of pre-defined doses of cholesterol directly into the striatum. We found that the 500µg dose was able to ameliorate both motor and cognitive defects as well as other disease phenotypes in HD mice (manuscript to be submitted). With this result in hand we are now focusing on developing a new generation of NPs able to deliver the desired dose of cholesterol to the HD mouse brain. NPs have been produced with an FDA approved polymer with optimized formulation procedures assuring improved cholesterol loading and optimal chemico-physical properties. We show that these new NPs cross the BBB, reach different brain regions, enter into different brain cells and efficiently release cholesterol in striatum and cortex over time with a different kinetics compared to peripheral tissues. Finally, preliminary results demonstrate that systemic and chronic administration of these NPs ameliorates cognitive and motor defects in HD mice.

Numerosi studi hanno dimostrato che la sintesi del colesterolo è ridotta nel cervello di molti modelli animali di malattia di Huntington (Huntington disease, HD) a partire dagli stadi pre-sintomatici della malattia, determinando una diminuzione dei livelli di colesterolo cerebrale che può influenzare l'attività neuronale.

In studi precedenti abbiamo dimostrato che il rilascio di 20 µg di colesterolo nel cervello mediante nanoparticelle polimeriche modificate per attraversare la barriera emato-encefalica (Chol-g7-NPs) migliora i difetti cognitivi in un modello animale HD (Valenza et al, 2015). Successivamente, per identificare la dose di colesterolo ottimale in grado di recuperare sia difetti cognitivi che motori, abbiamo utilizzato mini-pompe osmotiche per avere un continuo, definito e costante rilascio di dosi di colesterolo predefinite direttamente nello striato. I risultati ottenuti dimostrano che una dose pari a 500 µg è in grado di migliorare sia i difetti cognitivi che motori così come altri fenotipi associati alla malattia in un modello animale HD (manoscritto in sottomissione). Sulla base di questi risultati, stiamo sviluppando e testando una nuova generazione di nanoparticelle capaci di rilasciare la dose di colesterolo desiderata nel cervello del topo HD. Le nanoparticelle sono state prodotte utilizzando un

polimero approvato dalla FDA con procedure ottimizzate che assicurano un miglior caricamento di colesterolo e proprietà chimico-fisiche migliori rispetto alle precedenti.

I dati ottenuti dimostrano che le nuove nanoparticelle attraversano la barriera ematoencefalica, raggiungono diverse regioni cerebrali, entrano in diverse tipologie di cellule cerebrali e rilasciano nel tempo il colesterolo nello striato e nella corteccia con una cinetica diversa rispetto a quella osservata nei tessuti periferici. Infine, risultati preliminari dimostrano che la somministrazione sistemica e cronica di tali nanoparticelle migliora i difetti cognitivi e motori nei topi HD.

Valenza et al, Cholesterol-loaded nanoparticles ameliorate synaptic and cognitive function in Huntington's disease mice. EMBO Mol Med. 2015

Corea di Huntington

Coordinator: Elena Cattaneo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GGP17012

**Disease Name:**

Huntington's Disease

**Keywords:**

Huntington's disease, Cholesterol, nanoparticles

## Poster P.10.74

### DISSECTING THE MOLECULAR FUNCTION OF MUTANT HUNTINGTIN WITH STEM CELLS

Ferlazzo G.<sup>[1]</sup>, Angiolillo S.<sup>[1]</sup>, Carbognin E.<sup>[1]</sup>, Moro E.<sup>[1]</sup>, Leeb M.<sup>[2]</sup>, Maglione V.<sup>[3]</sup>, Martello G.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Molecular Medicine, University of Padua ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Max F. Perutz Laboratories, Vienna Biocenter ~ Vienna ~ Austria, <sup>[3]</sup>IRCCS, Neuromed ~ Pozzilli ~ Italy

Huntington Disease (HD) is an incurable neurodegenerative disorder caused by abnormal CAG expansion in the Huntingtin gene, leading to progressive loss of striatal neurons.

Several cellular changes are associated with the presence of mutant Huntingtin (mHTT), such as impaired proteasome function, loss of calcium homeostasis, mitochondrial dysfunction, transcriptional deregulation and altered vesicular transport. Yet, we do not know whether these changes are the cause of HD, or simply consequences of a general impairment in the cellular function. For this reason, we decided to perform an unbiased genome-wide screening looking for genes functionally involved in cytotoxicity induced by mHTT. We generated mouse Embryonic Stem cells expressing mHTT which recapitulated some of the molecular defects associated with HD, and used them for a gain-of-function screening based on insertional mutagenesis.

Such screening allowed the identification of over 100 candidate genes that are able to reduce the mHTT toxicity. We further validated and characterized some of the suppressors both in vitro and in an in vivo model of HD that we developed in Zebrafish and in the R6/2 mouse model. Those genes will represent novel promising therapeutic tools against HD.

Studio della funzione della proteina Huntingtin mutata mediante l'uso di cellule staminali

La corea o malattia di Huntington è una patologia neurodegenerativa incurabile caratterizzata da progressiva morte di neuroni dello striato e causata da una mutazione nel gene codificante per la proteina Huntingtin. A livello cellulare, numerose alterazioni di processi fondamentali sono state imputate alla presenza della proteina Huntingtin mutata (mHTT), ma risulta difficile discriminare tra le alterazioni che sono causa della patologia da quelle che ne sono conseguenza. Per questo motivo abbiamo deciso di eseguire uno screening genomico, ossia una procedura in cui in maniera casuale vengono attivati migliaia di geni diversi, per identificare quei rari geni in grado di ridurre le alterazioni cellulari osservate in presenza di mHTT. Per fare ciò abbiamo utilizzato delle cellule staminali embrionali murine, che permettono appunto studi di questo tipo grazie alla semplicità con cui il loro genoma può essere manipolato. Abbiamo identificato circa un centinaio di geni e di alcuni di loro abbiamo confermato la capacità di contrastare gli effetti tossici di mHTT in due modelli animali di malattia di Huntington, il pesce zebra ed il topo. Tali geni rappresentano nuovi potenziali strumenti terapeutici per la malattia di Huntington.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983.

Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* 90, 905-981.

Sipione S, Cattaneo E. Modeling Huntington's disease in cells, flies, and mice. (2001). Mol Neurobiol 23: 21–51.

Corea di Huntington

Coordinator: Graziano Martello

Partners: Enrico Moro, Martin Leeb, Vittorio Maglione

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

TCP13013

**Disease Name:**

Huntington's Disease

**Keywords:**

Huntington disease, stem cells, genetic screening

## Poster P.10.75

### **MIR-181A AND MIR-181B DOWNREGULATION AMELIORATES MITOCHONDRIAL-ASSOCIATED NEURODEGENERATION BY ENHANCING MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND MITOPHAGY**

Indrieri A.<sup>[1]</sup>, Carrella S.<sup>[1]</sup>, Spaziano A.<sup>[1]</sup>, Romano A.<sup>[1]</sup>, Fernandez--Vizarra E.<sup>[2]</sup>, Barbato S.<sup>[1]</sup>, Zeviani M.<sup>[2]</sup>, Surace E.M.<sup>[3]</sup>, De Leonibus E.<sup>[1]</sup>, Banfi S.<sup>[1]</sup>, **Franco B.\*<sup>[1]</sup>**

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>MRC Mitochondrial Biology Unit, University of Cambridge ~ Cambridge ~ United Kingdom, <sup>[3]</sup>Department of Translational Medical Science, University of Naples "Federico II ~ Napoli ~ Italy

Mitochondrial dysfunction underlies the pathogenesis of a variety of human neurodegenerative diseases, either directly, in the case of rare mitochondrial diseases (MDs), or indirectly, as in more common neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease (PD). Despite the efforts, effective therapies are still not available for these devastating conditions.

We demonstrated that microRNAs miR-181a and miR-181b (miR-181a/b) regulate key genes involved in mitochondrial biogenesis and function. We also showed that these miRNAs are involved in global regulation of mitochondrial turnover in the central nervous system through the coordinated activation of mitochondrial biogenesis and mitophagy.

We thus tested whether the modulation of these miRNAs could be therapeutically exploited in neurodegenerative conditions associated with primary impairment of mitochondrial activity. We first showed that miR-181a/b downregulation effectively protects neurons from cell death and significantly ameliorates the disease phenotype in different animal models of MDs, such as two medakafish models of Microphthalmia with Linear Skin Lesions, and chemical and genetic models of Leber Hereditary Optic Neuropathy1. In addition, our preliminary data also demonstrated amelioration of the disease phenotype in a mouse model of Leigh Syndrome, an often-fatal MD characterized by severe neurodegeneration.

We then tested whether miR-181a/b downregulation could also be effective in chemical models of secondary mitochondrial dysfunction. To this aim we generated medakafish and murine models of PD using the neurotoxin 6-OHDA, which is widely used for this purpose. Our data demonstrate that inactivation of miR-181a/b reduces the extent of nigrostriatal dopaminergic neurons death in both models and results in improved motor performances in the mouse PD model.

Altogether our results indicate that miR-181a/b act as hubs in mitochondrial homeostasis in the central nervous system. We propose these miRNAs may represent novel gene-independent therapeutic targets for a wide-range of neurodegenerative disorders caused by mitochondrial dysfunction.

La disfunzione mitocondriale è alla base di molte patologie neurodegenerative sia come conseguenza diretta alla disfunzione mitocondriale primaria come nel caso delle malattie mitocondriali (MD) sia in maniera indiretta come effetto secondario in malattie neurodegenerative comuni come la malattia di Parkinson. Nonostante gli sforzi fatti non ci sono ad oggi terapie efficaci per queste patologie.

Il nostro laboratorio ha dimostrato che i microRNA miR-181a e miR-181b (miR-181a/b) regolano geni importanti per la funzione e la biogenesi dei mitocondri. Infatti i nostri studi dimostrano che questi miRNAs sono coinvolti nella regolazione del ricambio dei mitocondri nel sistema nervoso centrale

attraverso l'attivazione coordinata della biogenesi mitocondriale e della mitofagia.

Abbiamo quindi testato se la modulazione dei livelli di questi miRNAs potesse essere utilizzata con effetti terapeutici nelle condizioni neurodegenerative associate a disfunzione mitocondriale. Abbiamo dapprima dimostrato che l'abbassamento dei livelli del miR-181a/b protegge i neuroni dalla morte cellulare e migliora in fenotipo di diversi modelli animali di MD come ad esempio due modelli in pesce della sindrome con microftalmia e lesioni cutanee e modelli chimici e genetici di Neuropatia ottica ereditaria di Leber1. Inoltre, i nostri dati preliminari dimostrano anche un miglioramento del fenotipo in un modello murino di malattia di Leigh, una malattia mitocondriale spesso fatale caratterizzata da un severo quadro neurodegenerativo.

Abbiamo quindi testato se l'abbassamento dei livelli di miR-181a/b potesse essere efficace anche in modelli chimici associati a disfunzione mitocondriale secondaria. Per questo scopo abbiamo generato modelli di malattia di Parkinson in pesce ed in topo utilizzando la neurotossina 6-OHDA. I nostri risultati dimostrano che l'inattivazione di questi miRNAs riduce il danno a carico dei neuroni dopaminergici della sostanza nigro-striatale in entrambi i modelli con miglioramento delle funzioni motorie nel modello murino.

Tutti insieme i nostri risultati indicano che i miR-181a/b hanno un ruolo importante nella omeostasi dei mitocondri nel sistema nervoso centrale. Sulla base dei nostri risultati proponiamo che questi miRNAs possano rappresentare un target terapeutico che funzioni nelle malattie neurodegenerative associate a disfunzione mitocondriale a prescindere dalla mutazione genetica sottostante.

Indrieri A, Carrella S, Romano A, Spaziano A, Marrocco E, Fernandez-Vizarra E, Barbato S, Pizzo M, Ezhova Y, Golia FM, Ciampi L, Tammaro R, Henao-Mejia J, Williams A, Flavell RA, De Leonibus E, Zeviani M, Surace EM, Banfi S, Franco B. EMBO Mol Med. 2019 May;11(5). pii: e8734. doi: 10.15252/emmm.201708734

Disfunzione Mitocondriale

Coordinator: Brunella Franco

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Mitochondrial Dysfunction

**Keywords:**

Mitochondrial dysfunction, neurodegenerative disorders, Parkinson's disease



## Poster P.10.76

### DISEASE' MECHANISMS AND PHARMACOLOGICAL TARGETING OF BEHAVIORAL SYMPTOMS IN SANFILIPPO SYNDROME.

De Risi M.<sup>[1]</sup>, Tufano M.<sup>[1]</sup>, Alvino F.<sup>[1]</sup>, Ferraro M.G.<sup>[1]</sup>, Pulcrano S.<sup>[2]</sup>, Bellenchi G.<sup>[2]</sup>, Marrocco E.<sup>[1]</sup>, Sorrentino C.<sup>[1]</sup>, Caiazzo M.<sup>[3]</sup>, Fraldi A.<sup>[1]</sup>, De Leonibus E.\*<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>CNR - IGB "Adriano Buzzati Traverso" ~ Naples ~ Italy,

<sup>[3]</sup>Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS) ~ Utrecht ~ Netherlands, <sup>[4]</sup>~ Italy

Autistic-like symptoms, including stereotyped behaviors and changes in sociability, characterize many neuropsychiatric developmental disorders, including rare genetic diseases such as Mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-III A). MPS-III A is a neurodegenerative lysosomal storage disorder characterized by the deficiency of the enzyme sulfamidase, which leads to altered metabolism of heparan sulfate (1).

In the early stage of the pathology, children with MPS-III A show autistic- like behavioural symptoms (ALBSs) (2); ALBSs in MPS-III A have dramatic impact on their life and are resistant to behavioural and classic antipsychotic therapies (3). The disease' mechanisms leading to ALBSs in MPS-III A remain unexplored.

In this study, we identified endophenotypes of ALBSs in young male MPS-III A mice, including social interaction impairment, increased stereotyped behaviours and hyperactivity. We then found that the identified ALBSs are associated to increased expression of mesencephalic tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons appearing early during development and followed by increased striatal dopamine content. These changes in TH expression can be reproduced in cellular models of the disease. This has high translational relevance not only for this rare pathology but also for dissecting possible disease' pathways leading to iatrogenic autism.

This study is supported by Sanfilippo Children Foundation and National MPS Society.

Basi neurobiologiche e trattamenti farmacologici per i sintomi comportamentali nella malattia di Sanfilippo

I sintomi simil-autistici, quali stereotipie e alterazioni nel comportamento sociale, caratterizzano molti disordini neuropsichiatrici, incluse le malattie genetiche rare come la Mucopolisaccaridosi IIIA (MPS-III A). La MPS-III A è un disordine lisosomiale neurodegenerativo caratterizzato dalla mancanza dell'enzima sulfamidasi, che determina un'alterazione nel metabolismo dell'eparan solfato (1).

Nelle fasi iniziali della patologia, i bambini affetti dalla MPS-III A presentano sintomi comportamentali molto simili all'autismo (2); tali sintomi hanno un impatto drammatico sulla loro vita e sono resistenti sia alle terapie comportamentali che al trattamento con gli antipsicotici comunemente usati in altre patologie psichiatriche (3). Tale difficoltà di trovare trattamenti efficaci potrebbe essere dovuta al fatto che le alterazioni neurobiologiche che causano questi sintomi nella MPS-III A rimangono per ora quasi completamente sconosciuti.

In questo studio abbiamo identificato i sintomi simil-autistici in un modello animale della MPS-III A, ad uno stadio precoce. Essi infatti presentano: difetti di interazione sociale, aumento dei comportamenti

stereotipati e iperattività. Inoltre, abbiamo scoperto che tali sintomi sono associati ad un incremento dell'espressione della tirosina idrossilasi (TH) nel mesencefalo, già a livello dello sviluppo embrionale, che determina un aumento della dopamina totale.

Queste alterazioni sono state riprodotte anche in un modello cellulare di malattia.

I risultati di questo studio hanno un'elevata rilevanza traslazionale non solo per le patologie rare ma anche perché possono essere utili per studiare i meccanismi che determinano l'autismo iatrogeno.

Questo studio è finanziato dalla Sanfilippo Children Foundation e dalla National MPS Society.

1. Valstar, M. J., Marchal, J. P., Grootenhuis, M., Colland, V. & Wijburg, F. A. Cognitive development in patients with Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome). *Orphanet journal of rare diseases* 6, 43, doi:10.1186/1750-1172-6-43 (2011).

2. Rumsey, R. K. et al. Acquired autistic behaviors in children with mucopolysaccharidosis type IIIA. *The Journal of paediatrics* 164, 1147-1151 e1141, doi:10.1016/j.jpeds.2014.01.007 (2014).

3. Tchan, M. C. & Sillence, D. Extrapiramidal symptoms and medication use in Mucopolysaccharidosis type III. *Journal of intellectual & developmental disability* 34, 275-279, doi:10.1080/13668250903070891 (2009).

#### Mucopolisaccaridosi tipo IIIA

Project TIGEM (Disease' mechanisms leading to dopaminergic dysfunction underlying behavioural symptoms in MPS-III A)

Coordinator: Elvira De Leonibus

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2018

Project TIGEM (New therapeutic strategies for the treatment of behavioural symptoms in MPS-III A)

Coordinator: Elvira De Leonibus

Partners: Giancarlo Parenti, Zhifeng Huang

Duration (N. Years): 1

Starting year: 2019

#### **Telethon Project (nr):**

TIGEM

#### **Disease Name:**

Mucopolysaccharidosis Type IIIA

#### **Keywords:**

MPS-III A, Behavioral symptoms, Tyrosine hydroxylase

## Poster P.10.77

### LYSOSOMAL AMYLOID DEPOSITION IMPAIRS AUTOPHAGY AND IS A DRUGGABLE TARGET FOR THE NEURODEGENERATION IN LYSOSOMAL STORAGE DISEASES

**Monaco A.**<sup>[1]</sup>, Maffia V.<sup>[1]</sup>, Sorrentino C.<sup>[1]</sup>, Sambri I.<sup>[1]</sup>, Ezhova Y.<sup>[1]</sup>, Giuliano T.<sup>[1]</sup>, Cacace V.<sup>[1]</sup>, Nusco E.<sup>[1]</sup>, De Risi M.<sup>[1]</sup>, De Leonibus E.<sup>[1]</sup>, Schrader T.<sup>[2]</sup>, Klarner F.<sup>[2]</sup>, Bitan G.<sup>[3]</sup>, Fraldi A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Duisburg-Essen ~ Essen ~ Germany, <sup>[3]</sup>University Of California, David Geffen School of Medicine ~ Los Angeles ~ United States of America

The aggregation of amyloidogenic proteins characterizes the onset of several neurodegenerative conditions. How amyloid aggregation causes neurotoxicity is not completely understood. Lysosomal storage diseases (LSDs) are metabolic disorders caused by inherited lysosomal deficiencies and characterized by lysosomal storage and autophagy dysfunction often associated with a neurodegenerative course. Here we found that several amyloid proteins, including  $\alpha$ -synuclein, PrP, Tau and amyloid  $\beta$ -protein progressively build up in the brain of a mouse model of mucopolysaccharidosis (MPS) type IIIA, one of the most common and severe types of LSDs. A major fraction of the amyloid deposit forms in perikaryal-localized lysosomes affecting lysosomal distribution and, therefore impairing autophagosome-lysosome encountering and autophagosome clearance. Treating MPS-IIIa mice with CLR01, a “molecular tweezer” that acts as a broad-spectrum inhibitor of self-assembly of multiple amyloidogenic proteins, restored lysosomal-autophagic flux and significantly ameliorated neuropathological signs. Together, these data provide a new neuropathogenic link between amyloid deposition and autophagy-lysosomal pathway and also identify CLR01 as a potent drug candidate for the treatment of MPS-IIIa and likely of other LSDs.

L'aggregazione amiloide lisosomiale danneggia l'autofagia risultando un possibile target per il trattamento terapeutico della neurodegenerazione nelle malattie da accumulo lisosomiale.

L'aggregazione di proteine amiloidogeniche determina l'insorgenza di diverse condizioni neurodegenerative. In che modo l'aggregazione amiloide causa neurotossicità però non risulta completamente compreso. Le malattie da accumulo lisosomiale (LSDs) sono patologie metaboliche causate da deficienza lisosomiale ereditaria, caratterizzate da accumulo lisosomiale e disfunzione autofagica, con forte coinvolgimento nella patologia del sistema nervoso centrale. In questo studio abbiamo dimostrato che diverse proteine amiloidogeniche come l' $\alpha$ -sinucleina, la proteina prionica, Tau e il peptide  $\beta$ -amiloide accumulano progressivamente nel cervello del topo modello della mucopolisaccaridosi (MPS) di tipo III-A, una delle forme più comuni e severe di LSDs. La maggior parte degli accumuli amiloidi si formano nei lisosomi localizzati nel corpo cellulare dei neuroni alterando la distribuzione dei lisosomi e di conseguenza l'incontro tra questi ultimi e gli autofagosomi impedendo di conseguenza la degradazione delle vescicole autofagiche. Trattando topi modello della MPS-IIIa con CLR01, una “pinzetta molecolare”, che agisce come inibitore ad ampio spettro dell'aggregazione di proteine amiloidogeniche abbiamo migliorato la funzionalità autofagica determinando un miglioramento dei sintomi della neuropatologia.

Complessivamente questi dati dimostrano una connessione neuropatologica tra gli aggregati amiloidi e il flusso autofagico identificando quindi la molecola CLR01 come un potente candidato per il

trattamento terapeutico della MPS-III A e probabilmente per altre LSDs.

Nessuna

Mucopolisaccaridosi tipo III A

Coordinator: Alessandro Fraldi

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Mucopolysaccharidosis Type III A

**Keywords:**

Neurodegenerative Disorder, Amyloid, Autophagy

## Poster P.10.78

### TARGETING LIPIDS IN CLN8-ASSOCIATED NCL DISEASES: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INTERACTION OF CLN8 WITH VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN-ASSOCIATED PROTEIN A (VAPA), AND GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS

Papasergi S.<sup>[1]</sup>, Saladino P.<sup>[1]</sup>, Tinnirello R.<sup>[2]</sup>, Cernigliaro C.<sup>[1]</sup>, Prioni S.<sup>[3]</sup>, Grassi S.<sup>[3]</sup>, Mauri L.<sup>[3]</sup>, Giussani P.C.<sup>[3]</sup>, Prinetti A.<sup>[3]</sup>, Guarneri P.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB), Department of Biomedical Sciences, CNR ~ Palermo ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB), Department of Biomedical Sciences, CNR ~ Italy, <sup>[3]</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, School of Medicine, University of Milan, Milan, Italy ~ Milano ~ Italy

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are autosomal recessive diseases with progressive dementia, motor disturbance, epilepsy, visual loss and early death, affecting mainly children but also adults. Mutations in 13 distinct genes cause NCLs with marked phenotypic heterogeneity and undefined pathomechanism. CLN8 gene shows wide complexity with 31 different mutations leading to late-infantile NCL variants (vLINCL) and progressive epilepsy with mental retardation (EPMR) ([www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml](http://www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml)). CLN8 encodes an ER-resident transmembrane protein with an ER-ERGIC retrieval signal, a TLC domain normally related to lipid sensing/trafficking, and possible multiple roles (1, 2). We proposed to study the functional meaning of CLN8-VAPA interaction previously characterized (Passantino et al., 2013), being VAPA an ER-docking-site for cytosolic lipid-binding-proteins responsible of ceramide transport, sphingolipid (SL), phospholipid and cholesterol synthesis/trafficking. We expect to define CLN8 implication in SL, and pinpoint the molecular bases of the phenotypic heterogeneity.

In the frame of the current project, using recombinant proteins and mammalian expression vectors (mono/bicistronic) encoding fICLN8, its subregions and fVAPA, and in vitro and in vivo assays, we identified a putative CLN8 region interacting with VAPA, that is highly conserved in vertebrates and bears some vLINCL mutations. In vitro SphingoStrips and TLC overlay assay revealed no direct binding of fICLN8 and subregions to ceramides; whereas, metabolic labeling studies showed kinetic changes in the ceramide pathway of HeLa cells overexpressing CLN8 and VAPA. Interestingly, CLN8 (presumably the N-terminus) was able to bind sulfatide, which regulates myelination; considering the myelin defects in NCLs (3), further studies are ongoing. Throughout site-directed-mutagenesis, we created a model of EPMR-type mutation. In cells expressing both EPMR and VAPA, we found a strong EPMR-VAPA interaction and higher sphingomyelin and cholesterol levels. We also generated CRISPR/Cas9 CLN8 KO clones that show to maintain survival and migration capacities similar to native HeLa cell line but grow as autophagy predisposed cells. In CLN8-KO clones, even though the high VAPA levels, the only difference observed in sphingolipid was a marked change in the ganglioside patterns, with a shift toward more complex species. The overall results indicate a multifaceted and at least in part novel role of CLN8 alone and with VAPA toward SL trafficking, also supported by the finding that fICLN8 and subregions were able to bind different phosphoinositides in vitro. We are underway using the newly created CRISPR-CERT KO clones to analyze this ceramide transporter as part of CLN8-VAPA complex and possible target of CLN8 dysfunction. Fibroblast cells of patients with CLN8-vLINCL and EPMR are being used to correlate phenotype/genotype divergences to the CLN8-VAPA complex.

Ruolo dei lipidi nelle patologie NCL associate a CLN8: interazioni strutturali e funzionali del CLN8 con la proteina vescicolare di membrana-associata alla proteina A (VAPA), e correlazioni genotipo-fenotipo.

Le ceroidolipofuscinosi neuronali (NCLs) sono un gruppo di malattie neurodegenerative principalmente dell'infanzia di tipo autosomico recessivo e associate a geni e variabili cliniche differenti. I sintomi comprendono un progressivo deterioramento cognitivo e motorio, epilessia, perdita della visione e morte precoce. 13 geni sono implicati nelle varie forme NCLs. Lo sviluppo della patogenesi NCL non è chiaro per la maggior parte delle forme i cui geni producono proteine dalla funzione sconosciuta. Ciò limita fortemente lo sviluppo di terapie risolutive a fronte delle attuali cure palliative e/o compassionevoli. Attualmente, il trattamento dei bambini con NCL tipo 2 (CLN2) è l'unica terapia con aspettative positive per il rallentamento dei sintomi devastanti. Ciò è reso possibile dalla conoscenza della CLN2, l'enzima lisosomiale tripeptidil peptidasi 1, il cui deficit è in parte compensato dalla somministrazione, seppure invasiva, dell'enzima sano.

Nelle forme di malattia associate a mutazioni del gene CLN8, è stata accertata una marcata eterogeneità associata alle diverse mutazioni, alle etnie, all'età di insorgenza e al tipo di sintomi; in generale mutazioni CLN8 vengono associate a varianti tardo-infantili di NCL e forme giovanili di epilessia con ritardo mentale (EPMR). Gli studi sulla proteina CLN8 localizzata nel reticolo endoplasmatico cellulare suggeriscono una diversità di funzione della proteina. Nell'ambito del progetto Telethon, i ricercatori stanno studiando una possibile funzione della proteina CLN8 sulla base della formazione di un complesso interattivo con la proteina VAPA che è nota regolare i lipidi ed in particolare gli sfingolipidi. Nel corso dello studio sono state messe in atto tecnologie ad hoc per simulare a livello cellulare condizioni di deficit parziale e totale della proteina CLN8, come la mutagenesi-sito diretta o la tecnologia CRSPR-Cas9; come pure sono state create sonde specifiche per produrre la forma sana di CLN8 e la proteina VAPA. E' in programmazione l'utilizzo di fibroblasti di pazienti affetti da CLN8-NCL o EPMR. Gli studi ad oggi suggeriscono un complesso ma incisivo ruolo della proteina CLN8 nella sintesi e traffico degli sfingolipidi, che in alcune condizioni viene supportato dalla presenza della proteina VAPA. Gli sfingolipidi sono implicati nello sviluppo e plasticità del sistema nervoso e la loro distribuzione spazio-temporale è essenziale al mantenimento delle funzioni neuronali. La validazione di questi risultati su cellule di fibroblasti di vari pazienti con diversa mutazione CLN8 e diverso quadro patologico, si prospetta come una valida chiave di definizione delle diversità fenotipiche dei pazienti e di approcci alla prognosi e terapia.

1. Passantino R, Cascio C, Deidda I, Galizzi G, Russo D, Spedale G, Guarneri P. Identifying protein partners of CLN8, an ER-resident protein involved in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta*. 1833: 529-40 (2013).
2. di Ronza A, Bajaj L, Sharma J, Sanagasetti D, Lotfi P, Adamski CJ, Collette J, Palmieri M, Amawi A, Popp L, Chang KT, Meschini MC, Leung HE, Segatori L, Simonati A, Sifers RN, Santorelli FM, Sardiello M. CLN8 is an endoplasmic reticulum cargo receptor that regulates lysosome biogenesis. *Nat Cell Biol*. 20: 1370-1377 (2018).
3. Kuronen M, Hermansson M, Manninen O, Zech I, Talvitie M, Laitinen T, Gröhn O, Somerharju P, Eckhardt M, Cooper JD, Lehesjoki AE, Lahtinen U, Kopra O. Galactolipid deficiency in the early pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscinosis model *Cln8<sup>mnd</sup>*: implications to delayed myelination and oligodendrocyte maturation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 38: 471-86 (2012).

Ceroidolipofuscinosi neuronali

Coordinator: Patrizia Guarneri

Partner: Alessandro Prinetti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16277

**Disease Name:**

Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCLs)

**Keywords:**

CLN8, VAPA, Sphingolipids

## Poster P.10.79

### AGE-DEPENDENT BEHAVIORAL DEFICITS AND PROTEIN AGGREGATION IN LRRK2 HG2019S MICE

Piccoli G.\*

*CIBIO- University of Trento ~ Trento ~ Italy*

Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons within the substantia nigra pars compacta and the formation of protein aggregates in surviving neurons. LRRK2 G2019S mutation is the major determinant of familial PD cases and leads to late-onset PD with pleomorphic pathology, including alpha-synuclein accumulation and deposition of protein inclusions. LRRK2 G2019S mouse model demonstrates an age-dependent motor and cognitive impairment. We observed the presence of aggregates containing N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) in basal ganglia specimen from G2019S carrier PD patients and in cellular and animal model expressing LRRK2 G2019S variant. We found that LRRK2 G2019S kinase activity affects NSF degradation and induces its accumulation in toxic aggregates. Noteworthy, induction of autophagy cleared NSF aggregation and rescued motor and cognitive impairment observed in aged hG2019S BAC mice. We suggest that LRRK2 G2019S pathological phosphorylation hampers substrates catabolism thus causing the formation of cytotoxic protein inclusions.

Deficit motori e aggregati proteici in un modello murino di Morbo di Parkinson

La malattia di Parkinson (PD) è un disturbo neurodegenerativo e del movimento caratterizzato dalla degenerazione dei neuroni dell'area cerebrale Pars Compacta della Substantia nigra e da aggregati proteici detti Corpi di Lewy. L'autofagia è il meccanismo chiave coinvolto nello smaltimento degli aggregati proteici e durante l'invecchiamento subisce una regolazione negativa. Il morbo di Parkinson familiare, di origine genetica comprovata, rappresenta meno del 10% di tutti i pazienti. Alcune proteine che giocano un ruolo predominante nell'autofagia sono state collegate a forme di parkinsonismo dominanti (ad esempio alfa-sinucleina e LRRK2) e recessive (ad esempio Parkina e PINK1).

L'alterazione dei meccanismi sottesi alla degradazione proteica possono causare un accumulo progressivo di specie proteiche tossiche che possono eventualmente condurre allo sviluppo della malattia di Parkinson. L'unica terapia ad oggi disponibile per la PD si basa sul trattamento sintomatico tramite levodopa che però risulta inefficace nei sintomi non-motori e scatena gravi effetti collaterali. Il nostro obiettivo è quello di aprire la strada a nuove opportunità terapeutiche che agiscano tramite la modulazione della degradazione proteica. Studi recenti hanno anche dimostrato che il Trealosio, un disaccaride naturale, è un potente attivatore dell'autofagia. Nel nostro studio abbiamo evidenziato che il trattamento con Trealosio attiva l'autofagi, riduce l'aggregazione proteica in vitro ed in vivo ed è in grado di revertire il fenotipo motorio e cognitivo in un modello murino di PD

LRRK2 G2019S kinase activity triggers neurotoxic NSF aggregation

Francesca Pischetta, Maria Daniela Cirnar, Luisa Ponzoni, Alice Biosa, Maria Perez Carrion, Michele Morari, Lifeng Pan, Elisa Greggio, Rina Bandopadhyay, Mariaelva Sala, Giovanni Piccoli  
bioRxiv 721266; doi: <https://doi.org/10.1101/721266>

Morbo di Parkinson



Coordinator: Giovanni Piccoli  
Duration (N. Years): 5  
Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

TCP14005

**Disease Name:**

Parkinson's Disease

**Keywords:**

LRRK2, Parkinson's disease, autophagy

## Poster P.10.80

### IMPLEMENTATION OF HUMAN NEURONAL CULTURES AND MOUSE MODELS OF PANTOTHENATE KINASE 2 DEFICIENCY TO INVESTIGATE PATHOGENIC MECHANISMS OF IRON-RELATED NEURODEGENERATION AND EVALUATE COENZYME A THERAPEUTIC EFFICACY

Santambrogio P.S.<sup>[1]</sup>, Di Meo I.<sup>[2]</sup>, Rubio A.<sup>[1]</sup>, Cavestro C.<sup>[2]</sup>, Ripamonti M.<sup>[1]</sup>, Carecchio M.<sup>[3]</sup>, Broccoli V.<sup>[1]</sup>, Taverna S.<sup>[1]</sup>, Tiranti V.<sup>[2]</sup>, Levi S.\*<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>IRCCS-Istituto C. Besta ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>~ Milano ~ Italy, <sup>[4]</sup>Vita-Salute San Raffaele University ~ Milano ~ Italy

Pantothenate Kinase- and CoA synthase-associated neurodegeneration (PKAN and CoPAN) are inborn errors of CoA metabolism belonging to a wide spectrum of diseases characterized by brain iron accumulation (NBIA) (1). PKAN is caused by mutations in PANK2, encoding the mitochondrial pantothenate kinase 2 while CoPAN is due to mutation in COASY. To study these disorders we generated in vitro and in vivo models. We established two different neuronal models starting from PKAN iPSCs: 1) one enriched in glutamatergic neurons, 2) one producing striatal-like medium spiny neurons, with a prevalence of GABAergic neurons and a variable amount of astrocytes. EM on PKAN glutamatergic neurons demonstrated the presence of electron dense aggregates in mitochondria, which nature was defined as calcium phosphate by electron spectroscopic imaging. Impairment of calcium homeostasis was verified by monitoring the activity of calcium-dependent enzyme calpain1, calcium waves in neuronal cells, and voltage dependent calcium currents. Our data suggest a higher concentration of cytosolic calcium in PKAN neurons vs. controls. Interestingly, the presence of calcification in the internal globus pallidus was confirmed by brain CT scan of PKAN patients. While iron accumulation was not detected in glutamatergic neurons, data obtained on striatal-like cultures suggest iron deposition in cells resembling astrocytes. This result prompted us to optimize a technique to directly differentiate astrocytes from iPSCs. Both PKAN and CoPAN mature astrocytes resulted positive for iron content in the majority of cells. To investigate the role of COASY in vivo, we generated a Coasy mouse model using the Cre-loxP technology. Given the ubiquitous expression of Coasy and the central metabolic role of CoA, the constitutive Coasy KO mouse was embryonic lethal. To test the effect of Coasy ablation in the nervous system we generated two transgenic lines: one expressing Cre under the rat synapsin promoter (Syn1), and the other expressing Cre under the human glial fibrillary acid protein (hGFAP) promoter. The Syn1-KO Coasy mice showed a very severe phenotype with premature death at around day 15 and a smaller brain with a preserved structure. We observed that the Coasy protein was reduced by ~30% as compared to control and the level of acetylated tubulin was reduced as well. CoA measurement is currently in progress. Investigation of iron metabolism in these mice demonstrated an increased expression of ferritin light chain, which could indicate an increased presence of iron, but no evidence of iron accumulation using the specific Perls staining. Our in vitro models recapitulate the human phenotype of iron accumulation in basal ganglia. Most importantly, CoA supplementation during differentiation into striatal-like medium spiny neurons and astrocytes reduced significantly the formation of iron granules. The newly generated in vivo model will be further characterized and used to test CoA effect.

Sviluppo di modelli di cellule nervose umane e di modelli murini affetti da carenza di pantotenato chinasi-2 utili per lo studio dei meccanismi patogenetici di neurodegenerazione da accumulo di ferro e per valutare l'efficacia terapeutica del coenzima A.

La neurodegenerazione associata a difetti di pantotenato chinasi e CoA sintasi (PKAN e CoPAN) sono errori congeniti del metabolismo del CoA, appartenenti a un ampio spettro di malattie caratterizzate dall'accumulo di ferro nel cervello (NBIA). La PKAN è causata da mutazioni in PANK2, un gene che codifica per la pantotenato chinasi 2 mitocondriale, mentre CoPAN è dovuto a mutazioni nella CoA sintasi (COASY). Per studiare questi disturbi abbiamo generato modelli in vitro e in vivo. Abbiamo ottenuto due diversi modelli neuronali differenziando iPSC da pazienti PKAN in neuroni glutamatergici e in neuroni simil-striatali, con una prevalenza di neuroni GABAergici e una quantità variabile di astrociti. La microscopia elettronica sui neuroni glutamatergici di PKAN ha dimostrato la presenza di aggregati nei mitocondri composti da fosfato di calcio. L'alterazione dell'omeostasi del calcio è stata verificata studiando l'attività calcio-dipendente dell'enzima calpain1, le dinamiche di calcio citoplasmatico nelle cellule neuronali e le correnti di calcio voltaggio-dipendenti. I risultati suggeriscono una maggiore concentrazione di calcio citosolico nei neuroni PKAN rispetto ai controlli. La presenza di calcificazioni nel cervello di pazienti PKAN è stata confermata dalla TAC. Mentre l'accumulo di ferro non è stato rilevato nei neuroni glutamatergici, nelle colture simil-striatali abbiamo osservato la deposizione di ferro in cellule astrocitarie. Per studiare il ruolo di COASY in vivo, abbiamo generato modelli di topo Coasy utilizzando la tecnologia Cre-loxP. Data l'espressione ubiquitaria di Coasy e il ruolo cruciale del CoA, il topo Coasy KO costitutivo era letale embrionale. Per testare l'effetto dell'ablazione del gene nel sistema nervoso abbiamo generato due linee transgeniche: una esprimente Cre sotto il promotore della sinapsina di ratto (Syn1) e l'altra esprimente Cre sotto il promotore della proteina acida fibrillare della glia (hGFAP). I topi Syn1-KO Coasy hanno mostrato un fenotipo molto grave caratterizzato da: morte prematura al giorno 15; un cervello più piccolo del controllo ma ben preservato; una riduzione del 30% della proteina Coasy rispetto al controllo; un livello di tubulina acetilata ridotto rispetto al controllo. Lo studio del metabolismo del ferro ha dimostrato una maggiore espressione della ferritina-L, che potrebbe indicare una maggiore presenza di ferro sebbene non abbiamo osservato accumulo di ferro usando la specifica colorazione di Perls. Abbiamo quindi sviluppato i primi modelli in vitro che ricapitolano il fenotipo umano. Inoltre, l'aggiunta di CoA durante la differenziazione neuronale/astrocitaria ha ridotto significativamente la formazione dei granuli di ferro.

(1) Levi S, Tiranti V. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders: Valuable Models Aimed at Understanding the Pathogenesis of Iron Deposition. *Pharmaceuticals* (Basel). 2019 Feb 9;12(1). pii: E27. doi: 10.3390/ph12010027.

Neurodegenerazione associata a pantotenato chinasi (PKAN) e Neurodegenerazione associata alla proteina COASY (CoPAN)

Coordinator: Sonia Levi

Partners: Vania Broccoli, Stefano Taverna, Valeria Tiranti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16234

**Disease Name:**

PKAN and CoPAN

**Keywords:**

neurodegeneration, iron, mitochondria

## Poster P.10.81

### **A NEW EXPLOITATION OF A PORPHYRIN WITH ANTI-PRION PROPERTIES: CHARACTERIZATION OF THE MECHANISM OF ACTION AND PRECLINICAL STUDIES IN MOUSE MODELS OF GENETIC PRION DISEASE**

Zucchelli C.<sup>[6]</sup>, Masone A.<sup>[5]</sup>, Caruso E.<sup>[1]</sup>, Restelli E.<sup>[5]</sup>, Comerio L.<sup>[5]</sup>, Vanni I.<sup>[2]</sup>, Tapella L.<sup>[5]</sup>, Lucchetti J.<sup>[5]</sup>, Duskey J.T.<sup>[4]</sup>, Cagnotto A.<sup>[5]</sup>, Cecatiello V.<sup>[7]</sup>, Di Bari M.<sup>[2]</sup>, Tosi G.<sup>[4]</sup>, Pasqualato S.<sup>[7]</sup>, Salmona M.<sup>[5]</sup>, Nonno R.<sup>[2]</sup>, Requena J.<sup>[3]</sup>, Gobbi M.<sup>[5]</sup>, Banfi S.<sup>[1]</sup>, Musco G.<sup>[6]</sup>, Chiesa R.<sup>[5]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli Studi dell'Insubria ~ Varese ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Superiore di Sanità ~ Rome ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Santiago de Compostela ~ Santiago de Compostela ~ Spain, <sup>[4]</sup>Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia ~ Modena ~ Italy, <sup>[5]</sup>Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS ~ Milan ~ Italy, <sup>[6]</sup>IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[7]</sup>Istituto Europeo di Oncologia IRCCS ~ Milan ~ Italy

Genetic prion diseases are invariably fatal neurodegenerative disorders caused by mutations in the gene encoding the cellular prion protein (PrPC), a cell surface glycoprotein expressed at the highest levels by neurons in the CNS. Mutant PrPC molecules tend to misfold and aggregate, leading to neuronal dysfunction and death; they can also acquire an infectious conformation (PrPSc or prion) which propagates by inducing misfolding of native PrPC. Promising therapeutic strategies include blocking PrPC to PrPSc conversion or depleting the substrate for PrPSc formation by reducing endogenous (mutant and wild-type) PrPC level. We identified a metal-porphyrin (VA01) with a remarkable anti-prion activity. The aims of this project were: 1) to characterize the mechanism of action of VA01; 2) to study its pharmacokinetic properties; and 3) to test its therapeutic efficacy in transgenic mouse models of genetic prion disease.

We applied NMR spectroscopy and other biophysical techniques to clarify at the molecular level the mechanism of action of VA01. We found that VA01 binds to recombinant human PrP (HuPrP) with micromolar affinity, and the binding is influenced by the coordinated metal. Thermal melt circular dichroism spectroscopic studies and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity experiments indicated changes in HuPrP stability, size and shape upon VA01 binding. These results suggest that VA01 alters PrP structure disfavoring conversion to PrPSc. Consistent with this, VA01 inhibited PrPSc formation in vitro, as assayed by PMCA (protein misfolding cyclic amplification), and reduced PrPSc levels in prion-infected cells and organotypic cerebellar cultures. Pharmacokinetics studies in rodents demonstrated that VA01 crosses the blood brain barrier (BBB) and is active in vivo when administered intraperitoneally; however, the amount of VA01 that reached the brain and its biological activity in the CNS were variable. Therefore, before testing the therapeutic efficacy of VA01 in genetic prion disease models, we needed to improve its brain penetration. Towards this aim, we loaded VA01 in functionalized nanoparticles which show a remarkable ability to cross the BBB and deliver drugs to the CNS.

Una nuova applicazione di una porfirina ad attività antiprionica: caratterizzazione del meccanismo d'azione e studi preclinici in modelli murini di malattie da prioni di origine genetica

Malattie da prioni genetiche

Coordinator: Roberto Chiesa

Partners: Stefano Banfi, Giovanna Musco

Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15225

**Disease Name:**

Prion Genetic Diseases

**Keywords:**

prion protein, protein-ligand interaction, synthetic porphyrins

## Poster P.10.82

### ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION AS A NOVEL STRATEGY TO BLOCK TOXICITY OF THE MUTANT ANDROGEN RECEPTOR IN SBMA

Cristofani R.<sup>[1]</sup>, Rusmini P.<sup>[1]</sup>, Galbiati M.<sup>[1]</sup>, Crippa V.<sup>[1]</sup>, Chierichetti M.<sup>[1]</sup>, Ferrari V.<sup>[1]</sup>, Tedesco B.<sup>[1]</sup>, Casarotto E.<sup>[1]</sup>, Pennuto M.<sup>[2]</sup>, Poletti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Università degli Studi di Padova ~ Padova ~ Italy

Spinobulbar Muscular Atrophy (SBMA) is an adult onset neuromuscular disease, which only affects males and it is caused by an expansion of a triplet CAG repeat sequence present in exon 1 of the androgen receptor (AR) gene. This sequence encodes an elongated polyglutamine tract (ARpolyQ) in the N-terminus of the AR protein, which has been proved to confer toxicity to the ARpolyQ, when this is activated in response to the binding which circulating androgens, the male sex hormonal steroids.

The therapeutic attempt testes so far for SBMA are based on strategies aimed to block androgen production and/or activity, as well as on AR down-regulation. The main side effect of these approaches are the appearance of relevant undesired endocrine dysfunction in male patients.

In this project, we proposed a novel therapeutic approach, which is aimed to “repair” the mutant AR by removing its toxic polyQ tract, without causing an AR loss of function.

To this aim we will test the possibility to enhance the synthesis of an AR isoform devoid of toxic polyQ tract, preventing the translation of the neurotoxic ARpolyQ. We will take advantage of the presence of an AUG translation start codon in the AR mRNA, which is located downstream the pathogenic CAG repeat. The use of this AUG leads to the production of an AR isoform (AR-A), which retains its androgenic activity, but lacks toxicity because is devoid of the elongated polyQ tract.

We therefore subdivided the project in three aims focused:

- to study AR-A and ARpolyQ levels during development and disease manifestation in SBMA mice, differentiated human SBMA iPSCs and muscle tissues of SBMA patients;
- to characterize crucial androgenic properties of AR-A comparing them with ARpolyQ;
- to develop an effective strategy to selectively drive AR-A translation in motoneurons and muscle cells. The shifting of translation from ARpolyQ to AR-A will be attempted via antisense oligonucleotide (ASO), phosphorodiamidate morpholino oligo (PMO), Locked nucleic acids (LNA) and a library of FDA-approved drugs and natural compounds;
- to test if the positive hits are active in human SBMA iPSCs derived motoneurons or muscle cells and SBMA flies.

We expect to impose AR initiation of translation at the II-AUG thus skipping the polyQ and produce nontoxic AR-A, thus decreasing the total amount of toxic ARpolyQ, without reducing the overall AR activity in target cells. This will provide a safe and tolerable potential treatment for SBMA patients.

INIZIO ALTERNATIVO DELLA TRADUZIONE COME NUOVA STRATEGIA PER BLOCCARE LA TOSSICITA' DEL RECETTORE DEGLI ANDROGENI MUTATO NELL'ATROFIA MUSCOLARE SPINALE E BULBARE (SBMA).

La SBMA è una rara malattia monogenica che colpisce i motoneuroni e il tessuto muscolare in soggetti adulti di sesso maschile. La malattia è dovuta alla mutazione di una sequenza ripetuta di una tripletta di nucleotidi citosina-adenina-guanina (CAG) presente nell'esone 1 del gene del recettore

degli androgeni (AR), normalmente di lunghezza variabile tra 20-25 ripetizioni nei soggetti sani e che risulta espansa ad oltre 36 ripetizioni nel paziente SBMA. Questa sequenza di nucleotidi viene tradotta in una sequenza allungata di aminoacidi di glutammina (tratto polyglutamminico, polyQ) nella proteina risultante di AR (ARpolyQ nel caso della forma mutata). La presenza di questa sequenza allungata di polyQ conferisce tossicità all'AR, ma solo quanto questo viene legato ed attivato dal suo ligando naturale testosterone. Queste osservazioni hanno spinto a ricercare farmaci capaci di inibire la produzione del AR o del suo ligando, che però posseggono considerevoli effetti collaterali di tipo endocrino.

In questo progetto abbiamo proposto un approccio innovativo che si avvantaggia dalla particolare struttura del gene dell'AR e del suo messaggero (RNA) utilizzato dalle cellule per produrre la proteina ARpolyQ tossica.

L'AR viene normalmente prodotto partendo da una sequenza di inizio chiamata AUG. Da questa sequenza la traduzione del messaggero (RNA) a proteina porta quasi immediatamente all'inserimento della sequenza tossica polyQ. Esiste però una seconda sequenza di inizio AUG, che si trova a valle dalla regione utilizzata per produrre il polyQ. Iniziando la produzione di AR da questa seconda sequenza di inizio AUG, si ottiene la formazione di un AR più corto, che però mantiene la sua attività, perdendo la sequenza tossica di polyQ.

Il nostro progetto ha lo scopo di comparare l'attività della forma lunga e corta di AR nei vari tessuti e di testare approcci generici e/o farmacologici che possano favorire la sintesi della forma corta di AR prova del polyQ e quindi della tossicità. L'identificazione di composti capaci di favorire questa nuova traduzione potrebbe originare farmaci con un grande potenziale terapeutico per la SBMA.

Rusmini P, Cortese K, Crippa V, Cristofani R, Cicardi ME, Ferrari V, Vezzoli G, Tedesco B, Meroni M, Messi E, Piccolella M, Galbiati M, Garre M, Morelli E, Vaccari T, Poletti A. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy*. 2018 Oct 18;(in press):1-21. doi: 10.1080/15548627.2018.1535292. PubMed PMID: 30335591.

Cristofani R, Crippa V, Rusmini P, Cicardi ME, Meroni M, Licata NV, Sala G, Giorgetti E, Grunseich C, Galbiati M, Piccolella M, Messi E, Ferrarese C, Carra S, Poletti A. Inhibition of retrograde transport modulates misfolded protein accumulation and clearance in motoneuron diseases. *Autophagy*. 2017 Aug 3;13(8):1280-1303. doi: 10.1080/15548627.2017.1308985. PubMed PMID: 28402699.

Zboray L, Pluciennik A, Curtis D, Liu Y, Berman-Booty LD, Orr C, Kesler CT, Berger T, Gioeli D, Paschal BM, Merry DE. Preventing the Androgen Receptor N/C Interaction Delays Disease Onset in a Mouse Model of SBMA. *Cell reports*. 2015 Dec 15;13(10):2312-23. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.019. PubMed PMID: 26673324.

Poletti A. The polyglutamine tract of androgen receptor: from functions to dysfunctions in motor neurons. *Front Neuroendocrinol*. 2004 Apr;25(1):1-26. doi: 10.1016/j.yfrne.2004.03.001. PubMed PMID: 15183036; eng.

Montie HL, Cho MS, Holder L, Liu Y, Tsvetkov AS, Finkbeiner S, Merry DE. Cytoplasmic retention of polyglutamine-expanded androgen receptor ameliorates disease via autophagy in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Human molecular genetics*. 2009 Jun 1;18(11):1937-50. doi:10.1093/hmg/ddp115. PubMed PMID: 19279159; eng.

Simeoni S, Mancini MA, Stenoien DL, Marcelli M, Weigel NL, Zanisi M, Martini L, Poletti A. Motoneuronal cell death is not correlated with aggregate formation of androgen receptors containing an elongated polyglutamine tract. *Human molecular genetics*. 2000 Jan 1;9(1):133-44. PubMed PMID: 10587588; eng.

Mizokami A, Chang C. Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen



receptor mRNA. The Journal of biological chemistry. 1994;269(41):25655-25659.

Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 Feb 15;91(4):1234-8. PubMed PMID: 8108393.

Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. Molecular and cellular endocrinology. 1996 Jun 18;120(1):51-7. PubMed PMID: 8809738.

Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare

Coordinator: Angelo Poletti

Partner: Maria Pennuto

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19128

**Disease Name:**

Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA)

**Keywords:**

Androgen receptor, polyglutamine, motoneuron

## Poster P.10.83

### **MOTOR NEURON DEGENERATION IN SPINAL AND BULBAR MUSCULAR ATROPHY: MOLECULAR APPROACHES TO COUNTERACT MUTANT ANDROGEN RECEPTOR NEUROTOXICITY**

Galbiati M.\*<sup>[1]</sup>, Cristofani R.<sup>[1]</sup>, Cicardi M.E.<sup>[1]</sup>, Meroni M.<sup>[1]</sup>, Crippa V.<sup>[1]</sup>, Ferrari V.<sup>[1]</sup>, Tedesco B.<sup>[1]</sup>, Chierichetti M.<sup>[1]</sup>, Casarotto E.<sup>[1]</sup>, Messi E.<sup>[1]</sup>, Piccolella M.<sup>[1]</sup>, Pennuto M.<sup>[2]</sup>, Cescon M.<sup>[2]</sup>, Bonaldo P.<sup>[2]</sup>, Boido M.M.<sup>[3]</sup>, Vercelli A.<sup>[3]</sup>, Rusmini P.<sup>[1]</sup>, Poletti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Università degli Studi di Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università degli Studi di Torino ~ Torino ~ Italy

The neuromuscular disease Spinal bulbar muscular atrophy (SBMA) associates with loss of bulbar or spinal motoneurons and skeletal muscle atrophy. SBMA is caused by a mutation of the androgen receptor (AR) gene resulting in a protein with an elongated polyglutamine (polyQ) tract. ARpolyQ acquires nuclear toxicity after binding testosterone, which induces AR nuclear translocation and ARpolyQ misfolding. Misfolded ARpolyQ is prone to aggregate, a process counteracted by the protein quality control (PQC) system. This system comprises chaperones and the degradative pathways (proteasome and autophagy). Several data suggest that misfolded ARpolyQ is mainly processed via autophagy, and causes autophagy flux blockage. Restoration of a functional autophagy is beneficial to cells expressing misfolded ARpolyQ. A peculiar form of autophagy is the "chaperone-assisted selective autophagy" (CASA), which relies on dynein-mediated retrograde transport of the CASA (HSPB8-BAG3-HSC70-CHIP) complex. This complex binds misfolded ARpolyQ enhancing its clearance. In immortalized motoneurons (MNs) and MNs derived from SBMA iPSCs we found that inhibition of dynein-mediated retrograde transport reduces ARpolyQ accumulation enhancing its clearance. This process is mediated by the HSC70 co-chaperone BAG1 which activates a compensatory mechanism alternative to HSPB8/BAG3. In the knock-in ARQ113 SBMA mouse model (KIARQ113), we found that in affected muscle both BAG1 and BAG3 are upregulated, with an increased BAG3:BAG1 ratio which preferentially routes misfolded ARpolyQ to autophagy.

On these basis and on our previous in vitro studies, we tested bicalutamide (an antiandrogen which prevents AR nuclear translocation) and trehalose (an autophagy activator) in KIARQ113 mice. We found that mice survival was not significantly modified by the treatments, but an apparent positive trend was present. In Rotarod test KIARQ113 mice the impaired motor coordination was completely recovered by trehalose treatment. Bicalutamide administered at early stages worsened this phenotype (probably because of its anti-anabolic effects on muscle development), but recovered the motor coordination phenotype when administered at later stages (when muscle reached the adulthood stage). Grip strength test in KI mice showed decreased forelimb muscle force, which was further decreased by early, but not late bicalutamide treatment. Histochemical analyses of mouse gastrocnemius reveal no variation associated to treatments in Feret min and max diameter of the KI mouse muscle fibers. Molecular analyses of gastrocnemius muscle of treated mice showed an increased PGC1 $\alpha$  expression, paralleled by an increased mitochondrial DNA content and enhanced mitochondrial complex levels (particularly of complex V - ATP synthase subunits and complex III). Thus, the combined trehalose/bicalutamide treatment ameliorates muscle energy production and counteracts ARpolyQ mediated toxicity in vivo.

## LA MORTE DEL MOTONEURONE NELL'ATROFIA MUSCOLARE SPINALE E BULBARE: APPROCCI MOLECOLARI PER CONTRASTARE LA TOSSICITÀ DEL RECETTORE DEGLI ANDROGENI MUTATO

L'atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA) è una malattia neuromuscolare in cui si ha perdita di motoneuroni a livello del bulbare e spinale con danni del muscolo scheletrico. La SBMA è dovuta alla mutazione del recettore degli androgeni che acquisisce un tratto poliglutamminico più lungo (ARpolyQ) di quello normalmente presente. L'ARpolyQ diventa tossico nel nucleo dopo il legame con testosterone che porta a conformazioni aberranti (misfolding) di ARpolyQ, che tende ad aggregare. L'aggregazione viene bloccata dal sistema di controllo di qualità proteico (PQC), che tuttavia risulta malfunzionante nella SBMA. Il potenziamento del sistema PQC migliora la rimozione di ARpolyQ misfoldato dalle cellule. Noi abbiamo identificato alcuni composti in grado di potenziare una via del sistema PQC, denominata "autofagia selettiva assistita da chaperone" (CASA), che comprende proteine quali HSPB8 e BAG3 coinvolte nella formazione del complesso CASA. Questi composti potenziano l'espressione di HSPB8, quindi del complesso CASA, e favoriscono la rimozione di ARpolyQ mutato.

In modelli animali di SBMA, abbiamo testato uno di questi, il trealosio, (noto attivatore dell'autofagia), con bicalutamide (antiandrogeno che mantiene l'ARpolyQ nel citoplasma dove avviene l'autofagia). Lo studio ha mostrato una tendenza all'aumento della sopravvivenza dell'animale sottoposto ai trattamenti (ma non significativa) e un recupero della coordinazione motoria e, in parte, della forza muscolare. Tuttavia, i trattamenti non hanno migliorato significativamente l'atrofia muscolare tipica dei modelli animali di SBMA, ma hanno aumentato le funzionalità mitocondriali nel muscolo, quindi dei processi che regolano l'energia cellulare. Su queste basi, riteniamo che il trattamento combinato possa servire a migliorare il quadro clinico di pazienti SBMA.

Synergic pro-degradative activity of trehalose and bicalutamide on the mutant Androgen Receptor responsible for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. Giorgetti E., Rusmini P., Crippa V., Cristofani R., Boncoraglio A., Cicardi M.E., Galbiati M., Poletti A\*. *Hum Mol Genet* (2015) 24(1):64-75. doi: 10.1093/hmg/ddu419 PMID: 25122660

Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells as a new model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. Dossena M., Bedini G., Rusmini P., Canazza A., Giorgetti E., Tosetti V., Salsano E., Sagnelli A., Navone S., Marfia G., Alessandri G., Corsi F., Fischbeck K.H., Parati E.A., Pareyson D., Poletti A\*. *Plos ONE* (2014) 9(11):e112746 doi: 10.1371/journal.pone.0112746 PMID: 25392924

Aberrant autophagic response in the muscle of a knock-in mouse model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. Rusmini P., Polanco M.J., Cristofani R., Cicardi M.E., Meroni M., Galbiati M., Piccolella M., Messi E., Giorgetti E., Lieberman A., Milioto C., Rocchi A., Aggarwal T., Pennuto M., Crippa V., Poletti A\*. *Sci Rep.* 5, 15174; doi: 10.1038/srep15174 (2015). DOI: 10.1038/srep15174 PMID: 26490709

210th ENMC International Workshop: Research and clinical management of patients with spinal and bulbar muscular atrophy. M. Pennuto, L. Greensmith, P. Pradat, G. Sorarù, A. Baniahmad, M. Basso, A. Cato, K. Fischbeck, J. Finsterer, P. Fratta, I. Gozes, M. Jokela, D. Pareyson, A. Poletti, C. Rinaldi, X. Salvatella, J. Vissing, P. Weydt. *Neuromuscular Disord* (2015) 25(10):802-12. Doi: 10.1016/j.nmd.2015.06.462

Transcriptional induction of the heat shock protein B8 mediates the clearance of misfolded proteins responsible for motor neuron diseases. Crippa V., D'Agostino V.G., Cristofani R., Rusmini P., Cicardi M.E., Messi E., Loffredo R., Pancher M., Piccolella M., Galbiati M., Meroni M., Cereda C., Carra S., Provenzani A., Poletti A\*. *Sci Rep.* 6, 22827; doi: 10.1038/srep22827 (2016). DOI: 10.1038/srep22827 PMID: 26961006

Exome sequencing identifies variants in two genes encoding the LIM-proteins NRAP and FHL1 in an Italian patient with BAG3 myofibrillar myopathy. D'Avila F., Meregalli M., Lupoli S., Barcella M., Orro A., De Santis F., Sitzia C., Farini A., D'Ursi P., Erratico S., Cristofani R., Milanese L., Braga D., Cusi D., Poletti A., Barlassina C., Torrente Y. *J Muscle Res Cell Motil.* (2016) 37(3):101-15 DOI: 10.1007/s10974-016-9451-7 PMID: 27443559

A surveillance function of the HSPB8-BAG3-HSP70 chaperone complex ensures stress granule integrity and dynamism. Ganassi M., Mateju D., Bigi I., Mediani L., Poser I., Lee H.O., Seguin S.J., Morelli F.F., Vinet J., Leo G., Pansarasa O., Cereda C., Poletti A., Alberti S., Carra S. *Mol Cell* (2016) 63, 796–810 doi: 10.1016/j.molcel.2016.07.021 PMID: 27570075

The Role of the protein quality control system in SBMA. Rusmini P., Crippa V., Cristofani R., Rinaldi C., Cicardi M.E., Galbiati M., Carra S., Malik B., Greensmith L., Poletti A. *J Mol Neurosci* (2016) 58(3), 348-364. DOI: 10.1007/s12031-015-0675-6. PMID: 26572535

The Role of the Heat Shock Protein B8 (HSPB8) in Motoneuron Diseases. Rusmini P., Cristofani R., Galbiati M., Cicardi M.E., Ferrari V., Vezzoli G., Tedesco B., Messi E., Piccolella M., Carra S., Crippa V., Poletti A. *Front Mol Neurosci* (2017) 10:176. doi: 10.3389/fnmol.2017.00176.

Inhibition of retrograde transport modulates misfolded protein accumulation and clearance in motoneuron diseases. Cristofani R., Crippa V., Rusmini P., Cicardi M.E., Meroni M., Licata N.V., Sala G., Giorgetti E., Grunseich C., Galbiati M., Piccolella M., Messi E., Ferrarese C., Carra S., Poletti A\*. *Autophagy* (2017) 13(8):1280-1303. doi: 10.1080/15548627.2017.1308985. PMID: 28402699

Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation, in models of motoneuron degeneration. Rusmini P., Cortese K., Crippa V., Cristofani R., Cicardi M. E., Ferrari V., Vezzoli G., Tedesco B., Meroni M., Messi E., Piccolella M., Galbiati M., Garrè M., Morelli E., Vaccari T., Poletti A. *Autophagy* (2019) 15:631-651. DOI: 10.1080/15548627.2018.1535292. PMID: 30335591

Autophagic and proteasomal mediated removal of mutant androgen receptor in muscle models of spinal and bulbar muscular atrophy. Cicardi M.E, Cristofani R., Crippa V., Ferrari V., Tedesco B., Casarotto E., Chierichetti M., Galbiati M., Piccolella M., Messi E., Carra S. , Pennuto M., Rusmini P., Poletti A. *Frontiers Endocrinol* (2019). DOI: 10.3389/fendo.2019.00569

The regulation of the small heat shock protein B8 in misfolding protein diseases causing motoneuronal and muscle cell death. Cristofani R., Rusmini P., Galbiati M., Cicardi M.E., Ferrari V., Tedesco B., Casarotto E., Chierichetti M., Messi E., Piccolella M., Carra S., Crippa V., Poletti A. *Front Neurosci, section Neuropharmacology* (2019) in press. DOI: 10.3389/fnins.2019.00796

The role of sex and sex Hormones in Neurodegenerative Diseases. Vegeto E., Villa A., Dalla Torre S.,

Crippa V. Rusmini P., Cristofani R., Galbiati M., Maggi A., Poletti A. Endocrine Rev. (2019) In press

Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare

Coordinator: Angelo Poletti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14039

**Disease Name:**

Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA)

**Keywords:**

Androgen receptor, polyglutamine, motoneuron

## Poster P.10.84

### TRANSLATING MOLECULAR PATHOLOGY INTO A THERAPEUTIC STRATEGY IN SCA38, A NEWLY IDENTIFIED FORM OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA.

Di Gregorio E.<sup>[1]</sup>, Manes M.<sup>[2]</sup>, Hoxha E.<sup>[3]</sup>, Ferrero M.<sup>[1]</sup>, Tripathy D.<sup>[4]</sup>, Di Campi A.<sup>[5]</sup>, Pavinato L.<sup>[1]</sup>, Costanzi C.<sup>[2]</sup>, Giorgio E.<sup>[1]</sup>, Pozzi E.<sup>[1]</sup>, Mitro N.<sup>[6]</sup>, Basso M.<sup>[4]</sup>, Sallese M.<sup>[7]</sup>, Caruso D.<sup>[6]</sup>, Tempia F.<sup>[3]</sup>, Brusco A.<sup>\*[1]</sup>, Borroni B.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Torino, Dept. Medical Sciences ~ Torino ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Brescia, Dept. of Clinical and Experimental Sciences, ~ Brescia ~ Italy, <sup>[3]</sup>Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi ~ Orbassano (TO) ~ Italy, <sup>[4]</sup>University of Trento, Centre for Integrative Biology ~ Trento ~ Italy, <sup>[5]</sup>Institute of Protein Biochemistry (IBP), Italian National Research Council (CNR) ~ Napoli ~ Italy, <sup>[6]</sup>University of Milan, Dept. of Pharmacological and Biomolecular Sciences, ~ Milano ~ Italy, <sup>[7]</sup>University 'G. d'Annunzio, Dept. of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, ~ Chieti ~ Italy

Spinocerebellar ataxias (SCA) are rare autosomal dominant, genetically heterogeneous, neurological disorders phenotypically mainly characterized by gait ataxia with cerebellar atrophy.

In 2014, we described spinocerebellar ataxia type 38 (SCA38) as associated with missense variants in the ELOVL5 gene. This gene encodes for an elongase, which is deputed to the synthesis of very long chain fatty acids, specifically DHA and EPA which are decreased in patients' serum.

Our research had two major aims: the study of SCA38 pathogenic mechanisms in cellular models and Elov15 knockout (ko) mice, and the efficacy evaluation of DHA in an off-label trial in humans.

In SCA38 cellular models, we showed that mutant ELOVL5-pGly230Val - the main missense pathogenic variant found in three of the four described SCA38 families - is mislocalized from the ER to the Golgi. This causes the enlargement of Golgi and alters the ER-to-Golgi transport. We also showed that the mutant ELOVL5-pGly230Val is likely misfolded and degraded by proteasome. It activates the ER-stress response pathway, overall behaving as a gain-of-function variant.

In the animal ko model, deficits in the principal functions of cerebellar Purkinje cells are absent. On the other hand, the impairment of action potential conduction along central and peripheral nerve fibers points to a more extensive deficit in myelination, confirmed by ultrastructural analysis of myelin sheaths, which resulted less compact. The lipidomic analysis highlighted a strong shift of phospholipids composition, from the long chain and polyunsaturated fatty acids, which are predominant in wild type mice, to shorter and more saturated ones, more abundant in Elov15 knock out animals. Overall, these results suggest that the reconstitution of the normal pattern of polyunsaturated fatty acids should rescue the ultrastructural and functional deficits of myelin. This will be a starting point to refine the therapy based on the administration of fatty acids deficient in the animal model as well as in SCA38 patients.

Our project indeed explored the use of DHA in patients with SCA38. In a double-blind, randomised, placebo-controlled study followed by a short-term and long-term open label phase, we demonstrated that oral DHA is a safe and effective treatment for SCA38 patients, claiming that it is the eligible therapy for SCA38. Based on our observation, we speculated that DHA is even beneficial in the presymptomatic stage of the disease to delay disease onset and slow the progression of symptoms. Suggested dosage was 600-1000 mg twice a day.

Our data overall show that the pathogenesis of SCA38 is likely a mix of loss-of-function and gain-of-function pathogenic mechanisms. Interestingly, both these pathways point to a similar treatment with DHA, which can compensate the loss, and induce a downregulation of the ELOVL5 expression.

Dal meccanismo patogenetico alla terapeutica in SCA38, una nuova forma di atassia spinocerebellare. Le atassie spinocerebellari (SCA) includono più di 30 diversi sottotipi di malattie del sistema nervoso centrale e colpiscono 1 persona su 30.000. Abbiamo identificato il gene che, se mutato, è causa della SCA38, una rara forma di atassia spinocerebellare associata a neuropatia. Il gene, chiamato ELOVL5, codifica per un enzima coinvolto nella sintesi di molecole note come acidi grassi omega-3, e la sua alterazione causa una riduzione degli omega-3 nel siero dei pazienti SCA38. Questo dato ha suggerito che integrare la dieta con specifici omega-3 potesse migliorare i sintomi nei pazienti.

Abbiamo pertanto condotto uno studio in doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo, seguito da una fase in aperto, e abbiamo dimostrato che il DHA è un trattamento privo di effetti collaterali ed efficace per la SCA38, determinando un miglioramento clinico e del metabolismo cerebellare, sia a breve che a lungo termine.

Il progetto ci ha permesso di comprendere i meccanismi patogenetici in SCA38 che si sono confermati essere sia da acquisto (produzione di una proteina dalla conformazione anomala) che da perdita di funzione (alterata localizzazione cellulare nell'apparato di Golgi). Questi dati si combinano con i risultati ottenuti nel modello murino in cui manca Elov15, dove è stato dimostrato che l'assenza del gene è sufficiente per causare una riduzione di volume del cervelletto, deficit motori e un difetto dei segnali nervosi che viaggiano lungo le fibre nervose. Questi deficit sono associati a difetti della mielina, la guaina isolante delle fibre nervose, attribuibili alla disorganizzazione del profilo lipidico. Questi risultati evidenziano l'importanza di ristabilire in SCA38 la corretta composizione dei lipidi, mediante trattamenti basati sulla dieta.

Di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E, Lacerenza D, Ferrero M, Lo Buono N, Ragusa N, Mancini C, Gausson M, Calcia A, Mitro N, Hoxha E, Mura I, Coviello DA, Moon Y-A, Tesson C, Vaula G, Couarch P, Orsi L, Duregon E, Papotti MG, Deleuze J-F, Imbert J, Costanzi C, Padovani A, Giunti P, Maillat-Vioud M, Durr A, Brice A, Tempia F, Funaro A, Boccone L, Caruso D, Stevanin G, Brusco A. ELOVL5 mutations cause Spinocerebellar Ataxia 38. *Am J Hum Genet.* Aug 7;95(2):209-17, 2014. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.001

Borroni B, Di Gregorio E, Orsi L, Vaula G, Costanzi C, Tempia F, Mitro N, Caruso D, Manes M, Pinessi L, Padovani A, Brusco A, Boccone L. Clinical and neuroradiological features of Spinocerebellar Ataxia 38 (SCA38). *Parkinsonism and related disorders* Jul;28:80-86, 2016.

Manes M, Alberici A, Di Gregorio E, Boccone L, Premi E, Mitro N, Pasolini MP, Pani C, Paghera B, Perani D, Orsi L, Costanzi C, Ferrero M, Zoppo A, Tempia F, Caruso D, Padovani A, Brusco A, Borroni B. DHA is a beneficial replacement treatment for Spinocerebellar Ataxia 38 (SCA38). *Annals of Neurology* Oct;82(4):615-621, 2017. doi: 10.1002/ana.25059. Epub 2017 Oct 22.

Hoxha E, Gabriele RMC, Balbo I, Ravera F, Masante L, Zambelli V, Albergro C, Mitro N, Caruso D, Di Gregorio E, Brusco A, Borroni B, Tempia F. Motor deficits and cerebellar atrophy in Elov15 knock out mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11:343, 1-11, 2017. 10.3389/fncel.2017.00343.

Manes M, Alberici A, Di Gregorio E, Boccone L, Premi E, Mitro N, Pasolini MP, Pani C, Paghera B, Orsi L, Costanzi C, Ferrero M, Tempia F, Caruso D, Padovani A, Brusco A, Borroni B. Long-term efficacy of Docosahexaenoic acid (DHA) for Spinocerebellar Ataxia 38 (SCA38) treatment: an open label extension study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019 Jun;63:191-194.

Atassia Spinocerebellare 38

Coordinator: Barbara Borroni

Partners: Alfredo Brusco, Donatella Caruso, Loredana Boccone, Filippo Tempia

**Telethon Project (nr):**

GGP14225

**Disease Name:**

Spinocerebellar Ataxia 38 (SCA38)

**Keywords:**

ataxia, therapy, pathogenic mechanism



# 11\_Inborn errors of metabolism

## Poster P.11.85

### OXIDATIVE LIPIDOMICS IN BARTH SYNDROME

Lobasso S., Lopalco P., Corcelli A.\*

UNIVERSITY OF BARI ALDO MORO ~ BARI ~ Italy

Mutations in the tafazzin gene cause Barth syndrome, a disease presenting cardiomyopathy, skeletal muscle weakness, fatigue, neutropenia, and abnormal growth. Excess of reactive oxygen (ROS) species has been detected in tafazzin defective cardiomyocytes and it is considered among the main factors responsible for impaired sarcomere function in Barth syndrome (Wang et al., Nature Medicine 2014). Although cardiolipin is considered the primary site of ROS attack in mitochondria, direct evidence

of the presence of oxidized cardiolipin forms in Barth syndrome is missing in the literature. In order to investigate on the possible role of oxidized cardiolipin forms in Barth syndrome, it is important to precisely

identify the chemical nature of oxidized cardiolipin forms and to study their effects on mitochondrial bioenergetic processes. In the present one-year research project, we plan to synthesize various oxidized

cardiolipin forms by using available literature protocols and to characterize the oxidized phospholipids by

MALDI-TOF/MS; preparative thin layer chromatography will be used to isolate and purify various oxidized

cardiolipin species that will be used as reference standards in lipidomic studies of Barth mitochondria. The lipid profiles of

heart mitochondria isolated from tafazzin-knock down (TAZ KD) mouse model of Barth syndrome will be

analysed by MALDI-TOF/MS to search for oxidized cardiolipin forms; lipidomic analyses of the different

respiratory chain complexes, isolated in native form from TAZ KD heart mitochondria, will be also performed.

Tests will be made on the effect of Bendavia, a mitochondria-targeting peptide, able to promote mitochondrial

respiration and ATP production, on the level of CL and CL oxidation products. The basic findings resulting from

the proposed investigation will help in unveiling the molecular role/effects of oxidized cardiolipin forms in Barth syndrome.

### FENOMENI OSSIDATIVI NELLA SINDROME DI BARTH: FOCUS SULLA CARDIOLIPINA

La sindrome di Barth (BTHS), altrimenti detta 3-metilglutaconico aciduria di Tipo 2, è una condizione rara, X-linked recessiva, metabolica e multi-sistemica, frequentemente letale, ad esordio infantile, caratterizzata da una sintomatologia eterogenea: cardiomiopatia dilatativa, miopatia scheletrica, neutropenia, ritardo della crescita, alterazione della struttura mitocondriale.

La BTHS è causata da mutazioni del gene TAZ, definito come G4.5, localizzato in posizione Xq28, e codificante per la proteina Tafazzina, un enzima che è coinvolto nel metabolismo della cardiolipina, il

principale fosfolipide mitocondriale. La sindrome colpisce quasi esclusivamente i maschi, mentre le madri portatrici delle mutazioni del gene TAZ sono asintomatiche.

Poiché recenti studi hanno dimostrato che nella sindrome di Barth si producono elevati livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danno luogo a diversi fenomeni ossidativi associati alla patologia, in questo studio ci proponiamo di esaminare in che modo i ROS modificano la cardiolipina e di individuare specificatamente le specie ossidate della cardiolipina presenti nel modello animale BTHS.

I livelli di cardiolipina e delle specie ossidate nei mitocondri isolati dal cuore del modello animale BTHS verranno determinate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF/MS. Per la precisa identificazione delle specie ossidate, si farà riferimento a standard di prodotti ossidati della cardiolipina, che verranno sintetizzati, isolati e purificati nel nostro laboratorio.

Nel nostro sistema sperimentale verranno inoltre studiati gli effetti del bendavia, una nuova molecola ad azione mitocondriale, che lega la cardiolipina con alta specificità. Il bendavia viene attualmente utilizzato in vari trial clinici e sembra essere in grado di alleviare l'affaticamento muscolare nei pazienti BTHS sulla base di risultati preliminari. Ci proponiamo quindi di valutare per la prima volta gli effetti del bendavia nei fenomeni ossidativi della cardiolipina nei cardiomiociti BTHS.

Una migliore comprensione dell'impatto dei fenomeni ossidativi nella fisiopatologia della Sindrome di Barth può contribuire allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici e cura della malattia.

Acehan D., Vaz F., Hotkooper RH., James J., Moore V., Tokunaga C., Kulik W., Wansapura J., Toth M.J., Strauss A. et al. (2011) Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome, *J. Biol. Chem.* 286, 899-908.

Angelini, R., Lobasso, S., Gorgoglione, R., Bowron, A., Steward, C.G., Corcelli, A. (2015) Cardiolipin fingerprinting of leukocytes by MALDI-TOF/MS as a screening tool for Barth syndrome *J. Lipid Res.* 56 (9):1787-1794.

Barth, P.G., Scholte, H.R., Berden, J.A., Van der Klei-Van Moorsel, J.M., Luyt-Houwen, I.E., Van 't Veer-Korthof, E.T., Van der Harten, J.J., and Sobotka-Plojhar, M.A. (1983) An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J. Neurol Sci.* 62: 327-355.

Clarke, S.L Bowron, A., Gonzalez, I.L., Groves, S.J., Newbury-Ecob, R., Clayton, N., Martin, R.P., Tsai- Goodman, B., Garratt, V., Ashworth, M., Bowen, V.M., McCurdy, K.R., Damin, M.K., Spencer, C.T., Toth, M.J., Kelley, R.I., and Steward, C.G. (2013) Barth syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 8: 23

Eaton, P, Li, JM, Hearse, DJ, Shattock, MJ. (1999) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *Am J Physiol.* 276(3 Pt 2):H935-43.

Phoon CK, Acehan D, Schlame M, Stokes DL, Edelman-Novemsky I, Yu D, Xu Y, Viswanathan N, Ren M. (2012) Tafazzin Knockdown in mice leads to a developmental cardiomyopathy with early diastolic dysfunction preceding myocardial noncompaction. *J Am Heart Assoc.* 1(2). pii: jah3-e000455.

Schlame, M., and Ren, M. (2006) Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett.* 580: 5450-5455

Soustek MS; Falk DJ; Mah CS; Toth MJ; Schlame M; Lewin AS; Byrne BJ. (2011). Characterization of a transgenic short hairpin RNA-induced murine model of Tafazzin deficiency. *Hum Gene Ther* 22(7):865-7

Szeto HH. (2014) First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol.* 171(8):2029-50.

Wang, G, McCain, ML, Yang, L, He, A, Pasqualini, FS, Agarwal, A, Yuan, H, Jiang, D, Zhang, D, Zangi, L, Geva, J, Roberts, AE, Ma, Q, Ding, J, Chen, J, Wang, DZ, Li, K, Wang, J, Wanders, RJ, Kulik, W, Vaz, FM, Laflamme, MA, Murry, CE, Chien, KR, Kelley, RI, Church, GM, Parker, KK, Pu, WT. (2014) Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nat Med.* 20(6):616-23.

Sindrome di Barth

Coordinator: Angela Corcelli

Duration (N. Years): 1

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19091

**Disease Name:**

Barth Syndrome

**Keywords:**

BARTH SYNDROME, CARDIOLIPIN, MITOCHONDRIA

## Poster P.11.86

### CREATINE DEFICIENCY SYNDROME: NOVEL INSIGHT INTO BRAIN FUNCTION AND THERAPEUTIC STRATEGIES

Baroncelli L.<sup>[1]</sup>, Gozzi A.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>IRCCS Fondazione Stella Maris ~ Calambrone (PI) ~ Italy, <sup>[2]</sup>Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) ~ Rovereto ~ Italy

Creatine Transporter Deficiency (CTD) is an X-linked inherited metabolic disorder presenting with cerebral creatine (Cr) deficiency, early intellectual disability, epilepsy and autistic-like behaviour. Although rare, CTD represents a major issue in health care, leading to a significant decrease of life expectancy and causing chronic illnesses with a large impact on patient quality of life and health-care system. There is no cure for this devastating disorder. Despite much knowledge about the natural history of CTD and the role of Cr in energy metabolism, little is known about the brain alterations underlying the impairment of multiple behavioural and cognitive domains in CTD. Resting on robust preliminary results, this project aims to explore how long-range and local brain circuits are affected by Cr depletion at different stages of disorder progression, and to devise gene therapy strategies to revert CTD-associated pathological defects and symptoms. By integrating imaging and electrophysiological techniques both in the mouse model and CTD patients, we will provide a unique characterization of brain morphological and neurofunctional alterations associated to CTD. Much of our efforts will be devoted to test a possible therapeutic strategy for CTD. Specifically, we will evaluate a gene therapy approach aimed to amend cellular dysfunction by exogenous provision of a functional copy of CrT gene in a well-established mouse model of CTD. We will exploit knowledge gained so far on the CTD mouse model to test this investigational product for the reestablishment of Cr and ATP physiological levels, the improvement of brain function, the suppression of epileptic phenotype and the recovery of a proper balance within neural circuits. We aim to provide evidence at the proof-of concept level for the feasibility of CrT protein replacement in the mouse model and for the reversibility of CTD phenotype, laying the basis for future development of CTD gene therapy approaches.

La carenza del trasportatore di creatina (CTD) è una malattia metabolica ereditaria legata all'X che presenta carenza di creatina cerebrale (Cr), disabilità intellettiva precoce, epilessia e comportamento simile all'autismo. Sebbene rara, la CTD rappresenta un grave problema per l'assistenza sanitaria, portando a una significativa riduzione dell'aspettativa di vita e causando uno stato di patologia cronica con un elevato impatto sulla qualità di vita dei pazienti. Non esiste una cura per questa patologia devastante. Nonostante l'approfondita conoscenza del quadro clinico della CTD e del ruolo della Cr nel metabolismo energetico, si sa molto poco circa le alterazioni cerebrali alla base della compromissione di molteplici domini comportamentali e cognitivi nella CTD. Basandosi su solidi risultati preliminari, questo progetto ha lo scopo di esplorare come i circuiti cerebrali sono influenzati dalla deplezione di Cr in diverse fasi della progressione del disturbo e di elaborare strategie di terapia genica per contrastare i sintomi patologici associati alla CTD. Integrando tecniche di imaging ed elettrofisiologia sia nel modello murino che nei pazienti con CTD, forniremo una caratterizzazione unica delle alterazioni morfologiche e neurofunzionali del cervello associate alla CTD. Gran parte dei nostri sforzi saranno dedicati a testare una possibile strategia terapeutica per CTD. In particolare, valuteremo un approccio di terapia genica volto a modificare la disfunzione cellulare mediante la

somministrazione esogena di una copia funzionale del gene CrT in un modello murino di CTD ben consolidato. Sfrutteremo le conoscenze acquisite finora sul modello di topo CTD per testare questo prodotto sperimentale per il ripristino dei livelli fisiologici di Cr e ATP, il miglioramento della funzione cerebrale, la soppressione del fenotipo epilettico e il recupero di un adeguato equilibrio all'interno dei circuiti neurali. Miriamo a fornire risultati robusti sulla reversibilità del fenotipo CTD, gettando le basi per il futuro sviluppo di approcci di terapia genica per la CTD.

1. L. Baroncelli et al., A novel mouse model of creatine transporter deficiency. *F1000Res.* 3, 228 (2014).
2. L. Baroncelli et al., A mouse model for creatine transporter deficiency reveals early onset cognitive impairment and neuropathology associated with brain aging. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4186–4200 (2016).
3. V. Leuzzi, M. Mastrangelo, R. Battini, G. Cioni, Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy. *Epilepsia.* 54, 217–227 (2013).
4. K. Mori et al., Neuroimaging in autism spectrum disorders: 1H-MRS and NIRS study. *J. Med. Invest.* 62, 29–36 (2015).
5. K. Y. Chan et al., Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 20, 1172–1179 (2017).
6. R. C. Challis et al., Widespread and targeted gene expression by systemic AAV vectors: Production, purification, and administration (2018), , doi:10.1101/246405.
7. J. M. van de Kamp, G. M. Mancini, G. S. Salomons, X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 715–733 (2014).
8. A. Chilosi et al., Treatment with L-arginine improves neuropsychological disorders in a child with creatine transporter defect. *Neurocase.* 14, 151–161 (2008).
9. R. Battini et al., Language disorder with mild intellectual disability in a child affected by a novel mutation of SLC6A8 gene. *Mol. Genet. Metab.* 102, 153–156 (2011).
10. A. Chilosi et al., Neuropsychological profile and clinical effects of arginine treatment in children with creatine transport deficiency. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 43 (2012).
11. M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 80, 1107–1213 (2000).
12. L. S. Almeida, G. S. Salomons, F. Hogenboom, C. Jakobs, A. N. M. Schoffemeer, Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse.* 60, 118–123 (2006).
13. T. Wallimann, M. Tokarska-Schlattner, U. Schlattner, The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids.* 40, 1271–1296 (2011).
14. J. M. van de Kamp et al., Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J. Med. Genet.* 50, 463–472 (2013).
15. M. Joncquel-Chevalier Curt et al., Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie.* 119, 146–165 (2015).
16. S. Mercimek-Mahmutoglu et al., Treatment of intractable epilepsy in a female with SLC6A8 deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 101, 409–412 (2010).
17. V. Valayannopoulos et al., Treatment by oral creatine, L-arginine and L-glycine in six severely affected patients with creatine transporter defect. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 151–157 (2012).
18. M. Dunbar, S. Jaggumantri, M. Sargent, S. Stockler-Ipsiroglu, C. D. M. van Karnebeek, Treatment of X-linked creatine transporter (SLC6A8) deficiency: systematic review of the literature and three new cases. *Mol. Genet. Metab.* 112, 259–274 (2014).
19. S. Jaggumantri et al., Treatment of Creatine Transporter (SLC6A8) Deficiency With Oral S-Adenosyl Methionine as Adjunct to L-arginine, Glycine, and Creatine Supplements. *Pediatr. Neurol.* 53, 360–363.e2 (2015).

20. Y. Kurosawa et al., Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J. Clin. Invest.* 122, 2837–2846 (2012).
21. S. R. Nash et al., Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels.* 2, 165–174 (1994).
22. S. Stöckler, F. Hanefeld, J. Frahm, Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. *Lancet.* 348, 789–790 (1996).
23. A. Schulze, F. Ebinger, D. Rating, E. Mayatepek, Improving treatment of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: reduction of guanidinoacetic acid in body fluids by arginine restriction and ornithine supplementation. *Mol. Genet. Metab.* 74, 413–419 (2001).
24. R. Battini et al., Creatine depletion in a new case with AGAT deficiency: clinical and genetic study in a large pedigree. *Mol. Genet. Metab.* 77, 326–331 (2002).
25. J. M. van de Kamp et al., Clinical features and X-inactivation in females heterozygous for creatine transporter defect. *Clin. Genet.* 79, 264–272 (2011).
26. E. R. Hautman et al., Female mice heterozygous for creatine transporter deficiency show moderate cognitive deficits. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 63–68 (2014).
27. A. Gozzi, A. J. Schwarz, Large-scale functional connectivity networks in the rodent brain. *Neuroimage.* 127, 496–509 (2016).
28. B. R. White et al., Imaging of Functional Connectivity in the Mouse Brain. *PLoS One.* 6, e16322 (2011).
29. L. Ferrari et al., A robust experimental protocol for pharmacological fMRI in rats and mice. *J. Neurosci. Methods.* 204, 9–18 (2012).
30. F. Sforazzini, A. J. Schwarz, A. Galbusera, A. Bifone, A. Gozzi, Distributed BOLD and CBV-weighted resting-state networks in the mouse brain. *Neuroimage.* 87, 403–415 (2014).
31. F. Sforazzini et al., Altered functional connectivity networks in acallosal and socially impaired BTBR mice. *Brain Struct. Funct.* 221, 941–954 (2016).
32. A. Bertero et al., Autism-associated 16p11.2 microdeletion impairs prefrontal functional connectivity in mouse and human. *Brain.* 141, 2055–2065 (2018).
33. A. Liska et al., Homozygous Loss of Autism-Risk Gene CNTNAP2 Results in Reduced Local and Long-Range Prefrontal Functional Connectivity. *Cereb. Cortex.* 28, 1141–1153 (2018).
34. A. Liska, A. Galbusera, A. J. Schwarz, A. Gozzi, Functional connectivity hubs of the mouse brain. *Neuroimage.* 115, 281–291 (2015).
35. L. Dodero et al., Neuroimaging evidence of major morpho-anatomical and functional abnormalities in the BTBR T+TF/J mouse model of autism. *PLoS One.* 8, e76655 (2013).
36. L. Pinto, Y. Dan, Cell-Type-Specific Activity in Prefrontal Cortex during Goal-Directed Behavior. *Neuron.* 87, 437–450 (2015).
37. A. Goel et al., Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible. *Nat. Neurosci.* 21, 1404–1411 (2018).
38. A. Z. Wasilczuk, A. Proekt, M. B. Kelz, A. R. McKinstry-Wu, High-density Electroencephalographic Acquisition in a Rodent Model Using Low-cost and Open-source Resources. *J. Vis. Exp.* (2016), doi:10.3791/54908.
39. W. Bosl, A. Tierney, H. Tager-Flusberg, C. Nelson, EEG complexity as a biomarker for autism spectrum disorder risk. *BMC Med.* 9, 18 (2011).
40. A. S. Al-Fahoum, A. A. Al-Fraihat, Methods of EEG signal features extraction using linear analysis in frequency and time-frequency domains. *ISRN Neurosci.* 2014, 730218 (2014).
41. R. Li, T. Potter, W. Huang, Y. Zhang, Enhancing Performance of a Hybrid EEG-fNIRS System Using Channel Selection and Early Temporal Features. *Front. Hum. Neurosci.* 11, 462 (2017).

42. R. Li, T. Nguyen, T. Potter, Y. Zhang, Dynamic cortical connectivity alterations associated with Alzheimer's disease: An EEG and fNIRS integration study. *Neuroimage Clin* (2018), doi:10.1016/j.nicl.2018.101622.
43. S. Lloyd-Fox, A. Blasi, C. E. Elwell, Illuminating the developing brain: the past, present and future of functional near infrared spectroscopy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 269–284 (2010).
44. R. E. Vanderwert, C. A. Nelson, The use of near-infrared spectroscopy in the study of typical and atypical development. *Neuroimage*. 85 Pt 1, 264–271 (2014).
45. T. Aihara et al., Cortical current source estimation from electroencephalography in combination with near-infrared spectroscopy as a hierarchical prior. *Neuroimage*. 59, 4006–4021 (2012).
46. R. Battini et al., Fifteen-year follow-up of Italian families affected by arginine glycine amidinotransferase deficiency. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 21 (2017).
47. T. Nguyen et al., EEG Source Imaging Guided by Spatiotemporal Specific fMRI: Toward an Understanding of Dynamic Cognitive Processes. *Neural Plast.* 2016, 4182483 (2016).
48. C. J. Stam, J. C. Reijneveld, Graph theoretical analysis of complex networks in the brain. *Nonlinear Biomed. Phys.* 1, 3 (2007).
49. J. J. Glascock et al., Delivery of therapeutic agents through intracerebroventricular (ICV) and intravenous (IV) injection in mice. *J. Vis. Exp.* (2011), doi:10.3791/2968.
50. A. Molinaro et al., A Nervous System-Specific Model of Creatine Transporter Deficiency Recapitulates the Cognitive Endophenotype of the Disease: a Longitudinal Study. *Sci. Rep.* 9, 62 (2019).
51. E. Vannini et al., Progression of motor deficits in glioma-bearing mice: impact of CNF1 therapy at symptomatic stages. *Oncotarget.* 8, 23539–23550 (2017).
52. B. Voelkl, L. Vogt, E. S. Sena, H. Würbel, Reproducibility of preclinical animal research improves with heterogeneity of study samples. *PLoS Biol.* 16, e2003693 (2018).
53. M. G. Alessandri, L. Celati, R. Battini, M. Casarano, G. Cioni, Gas chromatography/mass spectrometry assay for arginine: glycine-amidinotransferase deficiency. *Anal. Biochem.* 343, 356–358 (2005).
54. S. Dutta, P. Sengupta, Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 152, 244–248 (2016).
55. T. Kleefstra et al., Progressive intestinal, neurological and psychiatric problems in two adult males with cerebral creatine deficiency caused by an SLC6A8 mutation. *Clin. Genet.* 68, 379–381 (2005).
56. P. W. Wright et al., Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice. *PLoS One.* 12, e0185759 (2017).
57. L. Biagi et al., Age dependence of cerebral perfusion assessed by magnetic resonance continuous arterial spin labeling. *J. Magn. Reson. Imaging.* 25, 696–702 (2007).
58. K. K. E. Gadalla et al., Improved survival and reduced phenotypic severity following AAV9/MECP2 gene transfer to neonatal and juvenile male *Mecp2* knockout mice. *Mol. Ther.* 21, 18–30 (2013).

## Deficit del Trasportatore della Creatina

Coordinator: Laura Baroncelli

Partner: Alessandro Gozzi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2020

### Telethon Project (nr):

GGP19177



**Disease Name:**

Creatine Transporter Deficiency

**Keywords:**

Creatine transporter deficiency, Gene therapy, Brain circuits

## Poster P.11.87

### **CIRCULATING ANTI-GB3 ANTIBODY AS BIOMARKER OF MYOCARDIAL INFLAMMATION IN PATIENTS WITH FABRY DISEASE CARDIOMYOPATHY**

Chimenti C.\*, Verardo R., Grande C., Frustaci A.

*INMI L Spallanzani ~ Rome ~ Italy*

Background/Rationale: Fabry disease is a rare X-linked inborn error of glycosphingolipid catabolism caused by mutations in the alpha-galactosidase A gene (1). Cardiac involvement has drawn much attention as it is a major determinant of patients' survival and quality of life (2). Recently myocardial inflammation of autoimmune origin has been demonstrated in patients resistant to enzyme replacement therapy (ERT) (3). These observations forward the need of a sensitive and specific serologic biomarker of myocardial inflammation in order to halt, through administration of low dose immunosuppression, its deleterious effect on disease progression and ERT resistance.

Broad objectives and specific aims: Aim of the study is the assessment of circulating anti-GB3 antibody as biomarker of myocardial inflammation in patients with Fabry disease cardiomyopathy. Circulating levels of proinflammatory cytokines will be additionally obtained in order to evaluate the systemic reflexes of myocardial inflammation.

Research design and methods for achieving the stated objectives: From January 1996 to December 2018, 85 patients received in our Department the histological diagnosis of Fabry disease cardiomyopathy. Of these 85, 48 patients had an overlapping myocardial inflammation. The presence of antiGB3 antibodies will be retrospectively evaluated in the sera from all the 85 patients and controls. Circulating levels of anti-GB3 autoantibodies will be compared with the presence or absence of myocardial inflammation at histology and with the severity of Fabry disease cardiomyopathy. Circulating levels of systemic inflammatory biomarkers will be also assessed to evaluate systemic inflammatory activation. Lyso-Gb3 levels will be evaluated to define the burden of the disease.

Anticipated output: Based on our preliminary results, we expect to confirm that circulating anti GB3 antibodies represent a sensitive and specific biomarker of myocardial inflammation in patients with Fabry disease cardiomyopathy.

Anticorpi antiGB3 circolanti come biomarkers di infiammazione miocardica nella cardiomiopatia di Fabry

Background / Razionale: La malattia di Fabry è un raro errore congenito del catabolismo glicosfingolipidico legato al cromosoma X causato da mutazioni nel gene dell'alfa-galattosidasi A. Il coinvolgimento cardiaco ha attirato molta attenzione in quanto è importante determinante della sopravvivenza e della qualità della vita dei pazienti. Recentemente un'infiammazione miocardica di origine autoimmune è stata dimostrata in pazienti resistenti alla terapia enzimatica sostitutiva (ERT). Si rende quindi necessario identificare un biomarcatore sierologico sensibile e specifico dell'infiammazione del miocardio per arrestare, attraverso la somministrazione di immunosoppressione a basso dosaggio, l'effetto deleterio dell'infiammazione sulla progressione della malattia e sulla resistenza all' ERT.

Scopo dello studio è la valutazione della presenza di anticorpi anti-GB3 circolanti come biomarcatori di infiammazione miocardica in pazienti con cardiomiopatia da malattia di Fabry. Livelli

circolanti di citochine proinfiammatorie saranno inoltre ottenute al fine di valutare i riflessi sistemici dell'infiammazione miocardica.

Metodi: Da gennaio 1996 a dicembre 2018, 85 pazienti hanno ricevuto nel nostro dipartimento la diagnosi istologica della cardiomiopatia da malattia di Fabry. Di questi 85, 48 pazienti presentavano un'infiammazione miocardica sovrapposta. La presenza di anticorpi antiGB3 sarà retrospettivamente valutata nei sieri da tutti gli 85 pazienti e controlli. I livelli circolanti di autoanticorpi anti-GB3 saranno confrontati con la presenza o l'assenza di infiammazione miocardica all'istologia e con la gravità della cardiomiopatia di Fabry. Saranno inoltre valutati i livelli circolanti di biomarcatori infiammatori sistemici per valutare l'attivazione infiammatoria sistemica. I livelli di Lyso-Gb3 saranno valutati per definire la gravità della malattia di Fabry.

Risultati previsti: In base ai nostri risultati preliminari, prevediamo di confermare che gli anticorpi anti GB3 circolanti rappresentano un biomarcatore sensibile e specifico dell'infiammazione del miocardio nei pazienti con malattia di Fabry.

- 1.Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. Alpha-Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease. Edited by Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS, Valle D. New York, McGraw-Hall, 2001, p. pp. 3733-3774.
- 2.Germain DP: Fabry disease. Orphanet J Rare Dis 2010; 5:1-49
- 3.Frustaci A, Verardo R, Grande C, Galea N, Piselli P, Carbone I, Alfarano M, Russo MA, Chimenti C. Immune-Mediated Myocarditis in Fabry Disease Cardiomyopathy. J Am Heart Assoc. 2018 Sep 4;7(17).

Malattia di Fabry

Coordinator: Cristina Chimenti

Duration (N. Years): 1

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19171

**Disease Name:**

Fabry Disease

**Keywords:**

Fabry disease, Myocarditis, Cardiomyopathy

## Poster P.11.88

### **METABOLIC REPROGRAMMING OF T REGULATORY CELLS AS THERAPEUTIC TOOL TO DAMPEN THE IMMUNO-INFLAMMATORY RESPONSE ASSOCIATED TO ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS AFFECTED BY FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA**

**Bonacina F.**<sup>[2]</sup>, Martini E.<sup>[1]</sup>, Cremonesi M.<sup>[1]</sup>, Kallikourdis M.<sup>[1]</sup>, Norata G.D.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>IRCCS Humanitas Research Foundation ~ Rozzano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Excellence of Pharmacological and Biomolecular sciences, University of Milan ~ Milan ~ Italy

Familial Hypercholesterolaemia (FH) is a rare dominantly inherited condition due to mutations in the LDL Receptor (LDLR) gene and less frequently in apoB, PCSK9, STAP1 or LDLRAP1 genes. These mutations lead to impaired LDL clearance and increased plasma cholesterol levels that not only trigger LDL deposition in the skin and arteries, leading to extensive xanthomas formation and marked premature and progressive atherosclerotic disease, but also an immunoinflammatory response that contributes to atherosclerosis progression. Of note, even when LDL-C levels drop after intensive lipid lowering therapies, a latent inflammatory response may explain the residual CV risk observed in FH patients. Given the existing gap in the proper management of inflammation in these patients, this project aims at exploring a tailored immunotherapy of FH.

We have initially characterized lymphocyte T cells distribution in FH patients and age and sex matched controls by flow cytometry showing that FH patients present increased levels of Tregulatory cells (CD3/CD4/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup>/FOXP3<sup>+</sup>). Functional experiments, however, showed that Treg cells isolated from FH patients present a reduced ability in suppressing conventional Tcells proliferation compared to Treg cells from age and sex matched controls, thus pointing to a decreased immunosuppressive function of Treg and paving the road for testing strategies to increase Treg activity in FH patients. Indeed, decreasing the immuno-inflammatory response associated to the atherosclerotic plaque would dampen disease progression. Therefore, to gain tissue migration selectivity chemokine's signature was evaluated in the plaque of LDLR KO mice, the experimental model of FH. mRNA expression in WT and KO reveals that CX3CL1 is selectively expressed in the aorta of KO mice but not in other districts, suggesting that the ectopic expression of its matching CX3CR1 would drive Treg to the atherosclerotic plaque. Transduced CX3CR1 or ctrl WT Treg were injected in atherosclerotic KO mice. 24h after, CX3CR1-Treg were mainly detected in the aorta, while migration was limited and similar to that of ctrl-Treg in other districts, suggesting that the CX3CL1/CX3CR1 axis would represent a strategy to vehiculate Treg to the plaque. To evaluate the effect of engineered Treg on atherosclerosis progression, CX3CR1-Treg were adoptively transferred in LDLR KO mice after 4 additional weeks of WTD. Although levels of cholesterol were unchanged, treatment with CX3CR1-Treg significantly reduces plaque progression and lipid deposition, while ameliorates stability by increasing collagen and smooth muscle cells content.

Aim of the 2019 Telethon project is to explore whether metabolic reprogramming of FH Treg would reinstate their functions; this approach, together with genetic engineering with CX3CR1 expression, will be tested as a strategy to restore local immunosuppression in the atherosclerotic plaque thus limiting disease progression.

RIPROGRAMMAZIONE METABOLICA DI CELLULE T REGOLATORIE COME TRATTAMENTO DELLA RISPOSTA IMMUNO-INFIAMMATORIA ASSOCIATA ALL'ATHEROSCLEROSI IN PAZIENTI

## AFFETTI DA IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è dovuta a mutazioni nel gene LDLR e meno frequentemente nei geni apoB, PCSK9 o LDLRAP1. Queste mutazioni portano alla compromissione dell'eliminazione delle LDL e all'aumento dei livelli plasmatici di colesterolo che non solo innescano la deposizione di LDL nelle arterie, portando a severa aterosclerosi, ma anche ad una eccessiva risposta immuno-infiammatoria che contribuisce alla progressione della malattia. Da notare che, anche quando i livelli di colesterolo scendono dopo terapia, la presenza di una risposta infiammatoria latente può spiegare il rischio cardiovascolare residuo osservato nei pazienti FH. Considerata la scarsa gestione dell'infiammazione in questi pazienti, questo progetto mira ad esplorare l'immunoterapia nell'FH.

I pazienti FH presentano livelli aumentati di cellule Tregolatorie circolanti rispetto a controlli di pari età e sesso. Esperimenti funzionali, tuttavia, dimostrano una ridotta capacità di sopprimere la proliferazione dei linfociti T convenzionali rispetto alle cellule Treg isolate dai controlli, indicando quindi una ridotta funzione immunosoppressiva che potrebbe contribuire all'infiammazione osservata in pazienti FH. Pertanto, ridurre la risposta immuno-infiammatoria associata alla placca aterosclerotica potrebbe rappresentare una strategia per limitare la malattia. Per indirizzare le Treg nella placca aterosclerotica è stata valutata l'espressione di una serie di citochine nella placca aterosclerotica dei topi LDLRKO, il modello sperimentale di FH. CX3CL1 è risultata selettivamente espressa nell'aorta di topi KO ma non in altri distretti, suggerendo che l'espressione ectopica del suo recettore, CX3CR1, consenta la selettiva localizzazione delle Treg nella placca. Treg over-esprimenti CX3CR1 rispetto a cellule controllo sono state iniettate in topi KO. 24 ore dopo l'iniezione, le Treg-CX3CR1+ sono state rilevate principalmente nell'aorta, mentre la migrazione era limitata e simile a quella delle Treg controllo in altri distretti, suggerendo che l'asse CX3CL1/CX3CR1 rappresenti una strategia per veicolare le Treg nella placca. Per valutare l'effetto sulla progressione dell'aterosclerosi, le Treg-CX3CR1+ sono state trasferite LDLRKO e dopo 4 settimane valutato il decorso della malattia. Sebbene i livelli di colesterolo siano rimasti invariati, il trattamento con le Treg-CX3CR1+ riduce significativamente la dimensione della placca e la deposizione di lipidi, mentre migliora la stabilità aumentando il contenuto di collagene e cellule muscolari lisce.

Scopo del progetto Telethon 2019 è testare la riprogrammazione metabolica e genetica delle Treg dei pazienti FH come strategia per indurre un'immunosoppressione locale nella placca aterosclerotica limitando così la progressione della malattia.

1. Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci (Lond)*. 2018 Jun 21;132(12):1243-1252. doi:10.1042/CS20180306. Print 2018 Jun 29.
2. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *European heart journal*. 2013;34:3478-3490a. doi: 10.1093/eurheartj/ehz273
3. Yvan-Charvet L, Bonacina F, Guinamard RR, Norata GD. Immunometabolic function of cholesterol in cardiovascular disease and beyond. *Cardiovasc Res*. 2019 Jul 1;115(9):1393-1407. doi: 10.1093/cvr/cvz127.
4. Amanda C. Foks, Andrew H. Lichtman, Johan Kuiper. Treating Atherosclerosis with Regulatory T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Feb; 35(2): 280–287.
5. Galgani M, De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Role of Metabolism in the Immunobiology of Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2016 Oct 1;197(7):2567-75. doi: 10.4049/jimmunol.1600242.

Ipercolesterolemia Familiare

Coordinator: Giuseppe Danilo Norata  
Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19146

**Disease Name:**

Familial Hypercholesterolaemia

**Keywords:**

Hypercholesterolemia, Tregulatory cells, cell therapy

## 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



## Poster P.11.90

### INCREASED AUTOIMMUNITY RISK IN GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE 1B IS ASSOCIATED WITH ALTERATION OF REGULATORY T CELLS

**Carbone F.\*<sup>[1]</sup>**, Micillo T.<sup>[3]</sup>, Colamatteo A.<sup>[4]</sup>, Melis D.<sup>[6]</sup>, Assunto A.<sup>[2]</sup>, Perna F.<sup>[5]</sup>, Rossi A.<sup>[6]</sup>, Rosano C.<sup>[6]</sup>, Strisciuglio P.<sup>[6]</sup>, Parenti G.<sup>[6]</sup>, Matarese G.<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale-Consiglio Nazionale delle Ricerche (IEOS-CNR) ~ Napoli ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche e Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II ~ Napoli ~ Italy, <sup>[3]</sup>Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II ~ Napoli ~ Italy, <sup>[4]</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II ~ Napoli ~ Italy, <sup>[5]</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II ~ Napoli ~ Italy, <sup>[6]</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali - Università degli Studi di Napoli Federico II ~ Napoli ~ Italy

Glycogen storage disease type 1b (GSD-1b) is an autosomal-recessive disease caused by mutation of glucose-6-phosphate transporter, a protein localized in the of endoplasmic reticulum (ER) membrane involved in the process of hydrolysis of glucose-6-phosphate (G6P) to glucose and inorganic phosphate (1). Patients suffering from GSD-1b are characterized by metabolic alterations with fasting hypoglycemia, hepatomegaly, nephromegaly, lactic acidosis, hyperlipidemia, and hyperuricemia (2). Affected people also display neutrophil alterations such as impaired energy homeostasis and functionality, higher oxidative stress and apoptosis that lead to neutropenia (3). These neutrophil dysfunctions render GSD-1b patients more susceptible to recurrent bacterial infections (4). In addition, it has been reported that GSD-1b patients are characterized by an increased risk for developing autoimmune disorders such as chronic inflammatory bowel disease (5), Crohn's disease (6, 7), thyroid autoimmunity (8), and myasthenia gravis (9) although the molecular determinants leading to development of these diseases remain unknown. Most autoimmune diseases are characterized by the failure of peripheral tolerance mechanism mainly mediated by regulatory T (Treg) cell, a subset of CD4+ T cells expressing the transcription factor FOXP3 (10). The development and functions of Treg cells are also influenced by metabolic processes as it has been shown that the glycolytic enzyme enolase-1 is able to control the expression of specific FOXP3 splicing variants in human Tregs (11). Since glycolytic metabolism plays a key role in Treg cell induction and function, we evaluated whether metabolic alteration of GSD-1b patients, secondary to glucose-6-phosphate transporter mutation, could be related with Treg cell dysfunctions and increased autoimmunity risk. We observed that GSD-1b patients were characterized by lymphopenia and reduced capacity of T cells to engage glycolysis upon TCR stimulation (12). These metabolic alterations associated with lower expression of Foxp3, reduced Treg cell suppressive function together with impaired capacity of conventional T (Tconv) cells to induce the expression of specific FOXP3 splicing variants containing exon 2 upon suboptimal TCR stimulation (12). These data could clarify the link between the glucose metabolic alterations and the increased susceptibility to autoimmune disorders in GSD-1b subjects.

L'aumento del rischio di sviluppare malattie autoimmunitarie nella glicogenosi di tipo 1b è associato con l'alterazione delle cellule T regolatorie.

La glicogenosi di tipo 1b (GSD-1b) è una malattia genetica causata da una mutazione del trasportatore del glucosio (1). I pazienti che soffrono di questo disturbo del metabolismo sono caratterizzati dall'accumulo del glicogeno, la molecola di deposito del glucosio nell'organismo, e da

altre alterazioni tra cui ipoglicemia (bassi livelli di zuccheri nel sangue), ingrossamento del fegato e del rene, acidosi lattica, iperlipidemia (elevati livelli di colesterolo e trigliceridi nel sangue) e iperuricemia (elevati livelli di acido urico nel sangue) (2). Le persone colpite mostrano anche difetti di alcune cellule del sistema immunitario tra cui i neutrofili e sono caratterizzati da neutropenia (bassi livelli di queste cellule nel sangue) (3). Queste disfunzioni dei neutrofili rendono i pazienti con GSD-1b più sensibili alle infezioni batteriche (4). Inoltre, è stato riportato che i pazienti con GSD-1b sono caratterizzati da un aumentato rischio di sviluppare malattie autoimmunitarie come la malattia infiammatoria cronica intestinale (5), il morbo di Crohn (6, 7), la tiroidite autoimmune (8) e la miastenia gravis (9) sebbene ancora non sia stata ancora compresa la causa dello sviluppo di queste malattie. La maggior parte delle malattie autoimmunitarie è caratterizzata dal cattivo funzionamento o dalla riduzione del numero di alcune cellule chiamate cellule T regolatorie (Treg), che sono caratterizzate dalla presenza di una proteina chiamata Foxp3 (10). È stato evidenziato che sia lo sviluppo che le funzioni delle cellule Treg sono influenzati dal metabolismo del glucosio (11). In questo studio abbiamo valutato se il disturbo del metabolismo del glucosio che caratterizza i pazienti con GSD-1b, è correlato con le disfunzioni delle cellule Treg e con l'aumento del rischio di autoimmunità. Abbiamo osservato che i pazienti con GSD-1b sono caratterizzati da linfopenia (ridotto numero di linfociti nel sangue) e ridotto metabolismo di alcune cellule del sistema immunitario. Queste alterazioni metaboliche si associano con una minore espressione del Foxp3 nelle cellule Treg e con una riduzione della loro funzione (12). Questi dati potrebbero chiarire il legame tra le alterazioni metaboliche del glucosio e l'aumento della frequenza dei disturbi autoimmunitari nei soggetti con GSD-1b.

1. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med*. 2002 Mar;2(2):121-43.
2. Chen, Y. T. 2001. Glycogen storage disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, D. Valle, W. S. Sly, and V. Kinzler, eds. McGraw-Hill, New York, p. 1521-1551.
3. Jun HS, Weinstein DA, Lee YM, Mansfield BC, Chou JY. Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood*. 2014 May 1;123(18):2843-53.
4. Chou JY. The molecular basis of type 1 glycogen storage diseases. *Curr Mol Med*. 2001 Mar;1(1):25-44.
5. Visser G, Rake JP, Fernandes J, Labrune P, Leonard JV, Moses S, Ullrich K, Smit GP. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *J Pediatr*. 2000 Aug;137(2):187-91.
6. Dieckgraefe BK, Korzenik JR, Husain A, Dieruf L. Association of glycogen storage disease 1b and Crohn disease: results of a North American survey. *Eur J Pediatr*. 2002 Oct;161 Suppl 1:S88-92.
7. Melis D, Parenti G, Della Casa R, Sibilio M, Berni Canani R, Terrin G, Cucchiara S, Andria G. Crohn's-like ileo-colitis in patients affected by glycogen storage disease Ib: two years' follow-up of patients with a wide spectrum of gastrointestinal signs. *Acta Paediatr*. 2003 Dec;92(12):1415-21.
8. Melis D, Pivonello R, Parenti G, Della Casa R, Salerno M, Lombardi G, Sebastio G, Colao A, Andria

G. Increased prevalence of thyroid autoimmunity and hypothyroidism in patients with glycogen storage disease type I. *J Pediatr.* 2007 Mar;150(3):300-5, 305.e1.

9. Melis D, Balivo F, Della Casa R, Romano A, Taurisano R, Capaldo B, Riccardi G, Monsurrò MR, Parenti G, Andria G. Myasthenia gravis in a patient affected by glycogen storage disease type Ib: a further manifestation of an increased risk for autoimmune disorders? *J Inher Metab Dis.* 2008 Dec;31 Suppl 2:S227-31.

10. Mohr A, Atif M, Balderas R, Gorochov G, Miyara M. The role of FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune and inflammatory diseases. *Clin Exp Immunol.* 2019 Jul;197(1):24-35.

11. De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, Colamatteo A, Santopaolo M, Zuchegna C, Romano A, De Simone S, Procaccini C, La Rocca C, Carrieri PB, Maniscalco GT, Salvetti M, Buscarinu MC, Franzese A, Mozzillo E, La Cava A, Matarese G. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat Immunol.* 2015 Nov;16(11):1174-84.

12. Melis D, Carbone F, Minopoli G, La Rocca C, Perna F, De Rosa V, Galgani M, Andria G, Parenti G, Matarese G. Cutting Edge: Increased Autoimmunity Risk in Glycogen Storage Disease Type 1b Is Associated with a Reduced Engagement of Glycolysis in T Cells and an Impaired Regulatory T Cell Function. *J Immunol.* 2017 May 15;198(10):3803-3808.

Glicogenosi 1b

Coordinator: Giuseppe Matarese

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GGP17086

**Disease Name:**

Glycogen Storage Disease Type 1B

**Keywords:**

Autoimmunity, Regulatory T cells, Metabolism

## Poster P.11.91

### EXPLOITING A BACTERIAL REDOX CYCLER AGAINST MITOCHONDRIAL DISEASE LINKED TO RESPIRATORY COMPLEX III DYSFUNCTION

Peruzzo R.<sup>[1]</sup>, Corrà S.<sup>[1]</sup>, Costa R.<sup>[1]</sup>, Brischigliaro M.<sup>[1]</sup>, Leanza L.<sup>[1]</sup>, Zeviani M.<sup>[2]</sup>, De Pittà C.<sup>[1]</sup>, Costa R.<sup>[1]</sup>, Szabo I.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Cambridge ~ Cambridge ~ United Kingdom

Mutations in mitochondrial or nuclear DNA affecting the assembly or function of respiratory chain complexes can cause mitochondrial disorders resulting in mitochondrial dysfunction and lowered ATP production (1). This pathology that still lacks efficient treatments, severely affects tissues with high energy demand. Patients with complex III deficiency display a wide range of clinical manifestations due to a reduced ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase enzymatic activity. We identified a bacterial redox cycler that is able to accept electrons from ubiquinol and to reduce cytochrome c in vitro and thus it can provide an electron shunt pathway. While this molecule exerts toxicity due to its redox-active nature at high concentrations (at approximately hundred  $\mu\text{M}$ ), here we show that at sub-  $\mu\text{M}$  concentration it can rescue respiration and increase ATP production in intact fibroblast derived from patients harboring mutations in TTC19, an assembly factor required for correct complex III function. Importantly, the beneficial effects observed in vitro were confirmed in two independent animal models with TTC19 mutations: both in *Drosophila* and in zebrafish, administration of non-toxic, low concentrations of the drug increased mitochondrial fitness and significantly rescued the observed phenotype. In summary, our results point to the possibility of exploiting redox-active compounds as small molecules with possible therapeutic benefits for complex III disease.

Titolo: Una molecola di origine batterica migliora i difetti causati da una disfunzione del complesso III della catena respiratoria presente in alcune malattie mitocondriali

Mutazioni dei geni che codificano fattori di assemblaggio del complesso III della catena respiratoria mitocondriale oppure le loro subunità causano un malfunzionamento mitocondriale e un difetto nella produzione di ATP, la moneta energetica delle cellule. Queste mutazioni sono associate alle cosiddette malattie mitocondriali, che sono tuttora incurabili e compromettono il funzionamento dei tessuti caratterizzati da un fabbisogno energetico elevato, come per esempio i neuroni. Il nostro team ha identificato una molecola di origine batterica che è in grado di ripristinare la respirazione mitocondriale e di migliorare lo stato energetico delle cellule provenienti da pazienti con mutazioni a carico di fattori di assemblaggio del complesso III. Queste osservazioni sono state confermate anche in vivo, in modelli di pesci e nel moscerino della frutta, dove la somministrazione della molecola ha in gran parte corretto i difetti causati dalla malattia.

1. Ghezzi, D.; Zeviani, M., Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. *Essays in biochemistry* 2018, 62 (3), 271-286.

Sindrome di Leigh, sindrome Gracile

Coordinator: Ildiko Szabo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19118

**Disease Name:**

Mitochondria Complex III Disease

**Keywords:**

mitochondria, complex III disease, redox-active compound

## Poster P.11.92

### NOVEL THERAPEUTIC APPROACHES FOR COENZYME Q DEFICIENCY

Salviati L.\*<sup>[1]</sup>, Trevisson E.<sup>[1]</sup>, Acosta M.<sup>[1]</sup>, Calderan C.<sup>[1]</sup>, Baschiera E.<sup>[1]</sup>, Cerqua C.<sup>[1]</sup>, Pierrel F.<sup>[2]</sup>, Bernardi P.<sup>[4]</sup>, Navas P.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Women and Children's health ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>University Grenoble Alpes ~ Grenoble ~ France,

<sup>[3]</sup>Universidad Pablo de Olavide ~ Sevilla ~ Spain, <sup>[4]</sup>Dept. of Biomedical Sciences University of Padova ~ Padova ~ Italy

Coenzyme Q (CoQ) is a crucial component of the mitochondrial respiratory chain (RC), where it shuttles electron from complexes I and II to complex III. It is also a cofactor of other mitochondrial dehydrogenases, and an essential antioxidant in mitochondria and in other subcellular compartments. CoQ biosynthesis in eukaryotes is still an incompletely understood process which involves at least 12 genes. Mutations in these genes cause primary CoQ deficiency, a clinically heterogeneous group of disease which range from fatal neonatal multisystem disorders to isolated encephalopathy or nephropathy.

Patients with CoQ deficiency often respond to CoQ supplementation, however treatment is still problematic due to poor bioavailability of CoQ, and in the long term we observe progression of the disease despite treatment. It is therefore important to investigate novel therapeutic approaches .

In the course of the project we have used genome editing techniques to develop cellular models of CoQ deficiency. We have obtained several important results:

- 1) We were able to determine the exact sequence of reactions of CoQ biosynthesis in eukaryotes, showing that after condensation of the aromatic ring with the polliisoprene tail catalised by COQ2, the precursor is decarboxylated and the hydroxilated in C1 carbon, only after that reaction the hydroxylation of carbon C5 by COQ6 can occur.
- 2) We have shown that vanillic acid (VA) can bypass COQ6 defects in cells restoring Electron flow in the RC and ATP synthesis. VA can also normalize cytosolic ROS production in COQ6-deficient cells, wherease CoQ supplementation cannot.
- 3) We have determined that both CoQ4 (a short chain analogue of CoQ10) and QS10 (a metabolite of idebenone) may restore electron flow in CoQ deficient cells, while (contrary to what has been published) vitamin K2 is not active.

Overall these findings identify novel therapeutic approaches for this disease.

#### Nuovi approcci terapeutici per il deficit di Coenzima Q

Il coenzima Q (CoQ) è un componente cruciale della catena respiratoria mitocondriale (RC), dove trasferisce elettroni dai complessi I e II al complesso III. È anche un cofattore di altre deidrogenasi mitocondriali e un antiossidante essenziale sia a livello mitocondriale che in altri compartimenti subcellulari. La biosintesi del CoQ negli eucarioti è un processo ancora non completamente delineato, che coinvolge almeno 12 geni. Le mutazioni di questi geni causano il deficit primitivo di CoQ, un gruppo clinicamente eterogeneo di condizioni il cui spettro clinico va dai patologie fatali ad esordio neonatale a quadri di encefalopatia isolata o nefropatia ad esordio in età adulta.

I pazienti con carenza di CoQ spesso rispondono alla supplementazione di CoQ, tuttavia il trattamento è ancora problematico a causa della scarsa biodisponibilità del CoQ, e nel lungo periodo osserviamo la progressione della malattia nonostante il trattamento. È quindi importante studiare nuovi approcci

terapeutici.

Nel corso del progetto abbiamo utilizzato tecniche di editing del genoma per sviluppare modelli cellulari di carenza di CoQ. Abbiamo ottenuto diversi risultati importanti:

1) Siamo riusciti a determinare l'esatta sequenza di reazioni biosintetiche negli eucarioti, dimostrando che dopo la condensazione dell'anello aromatico con la coda di poliisoprene catalizzata da COQ2, il precursore viene decarbossilato e idrossilato in posizione C1. Solo dopo questa reazione può avvenire l'idrossilazione del carbonio C5 da parte di COQ6.

2) Abbiamo dimostrato che l'acido vanillico (VA) può bypassare i difetti di COQ6 ripristinando il flusso di elettroni nella RC e la sintesi di ATP. Il VA può anche normalizzare la produzione di ROS citosolici, mentre la supplementazione con CoQ è solo parzialmente efficace.

3) Abbiamo determinato che sia il CoQ4 (un analogo a catena corta del CoQ10) sia il QS10 (un metabolita dell'idebenone) possono ripristinare il flusso di elettroni nelle cellule carenti di CoQ, mentre (contrariamente a quanto è stato pubblicato) la vitamina K2 non è attiva.

Complessivamente questi risultati identificano nuovi approcci terapeutici per questa malattia.

1: Acosta Lopez MJ, Trevisson E, Canton M, Vazquez-Fonseca L, Morbidoni V, Baschiera E, Frasson C, Pelosi L, Rascalou B, Desbats MA, Alcázar-Fabra M, Ríos JJ, Sánchez-García A, Basso G, Navas P, Pierrel F, Brea-Calvo G, Salviati L. Vanillic Acid Restores Coenzyme Q Biosynthesis and ATP Production in Human Cells Lacking COQ6. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Jul 10;2019:3904905.

2: Cerqua C, Casarin A, Pierrel F, Vazquez Fonseca L, Viola G, Salviati L, Trevisson E. Vitamin K2 cannot substitute Coenzyme Q(10) as electron carrier in the mitochondrial respiratory chain of mammalian cells. *Sci Rep*. 2019 Apr 25;9(1):6553.

3: Giorgio V, Schiavone M, Galber C, Carini M, Da Ros T, Petronilli V, Argenton F, Carelli V, Acosta Lopez MJ, Salviati L, Prato M, Bernardi P. The idebenone metabolite QS10 restores electron transfer in complex I and coenzyme Q defects. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018 Sep;1859(9):901-908.

Malattie Mitocondriali

Coordinator: Luca Scorrano

Partner: Leonardo Salviati, Valerio Carelli, Paolo Bernardi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14187

**Disease Name:**

Mitochondrial Diseases

**Keywords:**

Mitochondrial disorders, CoQ deficiency, Bypass therapy



## Poster P.11.93

### HEMATOPOIETIC STEM CELL GENE THERAPY FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I, HURLER VARIANT (MPS-IH).

**Bernardo M.E.** <sup>[1]</sup>, Gentner B.<sup>[1]</sup>, Tucci F.<sup>[1]</sup>, Fumagalli F.<sup>[1]</sup>, Ciotti F.<sup>[1]</sup>, Sarzana M.<sup>[1]</sup>, Pontesilli S.<sup>[2]</sup>, Baldoli C.<sup>[2]</sup>, Filisetti C.<sup>[2]</sup>, Miglietta S.<sup>[1]</sup>, Acquati S.<sup>[1]</sup>, Redaelli D.<sup>[1]</sup>, Zonari E.<sup>[1]</sup>, Rovelli A.<sup>[3]</sup>, Parini R.<sup>[3]</sup>, La Marca G.<sup>[4]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>SR-Tiget ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>Ospedale San Gerardo ~ Monza ~ Italy, <sup>[4]</sup>Ospedale Meyer ~ Firenze ~ Italy

#### Introduction

Mucopolysaccharidosis type I Hurler (MPSIH) is a lysosomal storage disease due to  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) deficiency. The current therapeutic strategy is allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation which shows limited efficacy on bone and neurocognitive development.

#### Methods

A Phase I/II HSC-gene therapy (GT) trial opened in May 2018 evaluating safety, tolerability and efficacy of autologous, IDUA lentiviral-transduced CD34+ cells in MPSIH patients (pt) undergoing myeloablative conditioning. The study foresees the enrollment of 6 pt who lack a non-heterozygous HLA-matched donor and display an IQ/DQ>70. Primary endpoint of efficacy is IDUA activity in peripheral blood up to supraphysiologic levels at 1 year post-GT. Treatment impact on nervous system and bone is assessed by measurement of IDUA in CSF, DQ/IQ and specific radiologic parameters.

#### Results

By July 2019, six patients have been treated at a median age of 24 months (range: 14-34), with a median follow up of 4 months (range: 1-13). HSC harvest by mobilization was uneventful and effective resulting in cryopreserved drug products of resulting in drug products with a median of 21 million CD34+cells/kg (range: 13-29); in evaluable pt hematologic recovery was fast. Pt 1 and 2 reached supra-normal levels of IDUA activity by day+14 and stabilized at 10 folds above the mean of normal range, along with an in vivo vector copy number ranging from 2 to 4 in multiple hematopoietic lineages. Early after GT (d+90) IDUA activity was detected in CSF, and urinary GAGs were reduced to near-normal levels. Pt 1 maintained these results at d+180. From 2 months after GT his growth velocity (cm/y) shifted from -2.4 to 0.5 SD. Other pt are currently under evaluation.

#### Conclusion

Our preliminary results suggest an early metabolic correction of the enzyme defect. Long term-follow up and treatment of further pt are needed to confirm that IDUA supranormal levels result in improvement of neurological and bone outcomes as compared with allogeneic HSC transplantation.

Terapia genica ex-vivo con cellule staminali ematopoietiche per la Mucopolisaccaridosi di tipo I, Hurler

Fraldi A, Serafini M, Sorrentino NC, Gentner B, Aiuti A, Bernardo ME. Gene therapy for mucopolysaccharidoses: in vivo and ex vivo approaches. Ital J Pediatr. 2018 Nov 16;44(Suppl 2):130. doi: 10.1186/s13052-018-0565-y.

Mucopolisaccaridosi di tipo I Hurler

Coordinator: Alessandro Aiuti

Partners: Maria Ester Bernardo; Bernard Gentner

**Telethon Project (nr):**

TGT16E06

**Disease Name:**

MPSIH

**Keywords:**

ex-vivo gene therapy, Hurler Syndrome, metabolic correction

## Poster P.11.94

### IN VIVO INDUCTION OF AG-SPECIFIC TOLERANCE BY HEPATOCYTE-TARGETED GENE TRANSFER.

Squeri G., Russo F., Curto R., Sala L., Cesana L., Naldini L., Annoni A.\*, Gregori S.

*San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy*

The LV.ET.142T platform has been effectively applied for gene replacement therapy in hemophilia B or for promoting/restoring Ag-specific tolerance in autoimmune diabetes (T1D), sustaining hepatocyte-targeted gene transfer as a novel way to promote tolerance. We demonstrated that a single administration of LV.ET.142T encoding for insulin B chain 9-23 (LV.InsB) in hepatocytes, arrests beta cells destruction in NOD mice at advanced pre-diabetic stage, by generating InsB-specific FoxP3+ T regulatory cells (Tregs) (1). Now we show that LV.InsB in combination with a suboptimal dose of anti-CD3 mAb (CT) reverts diabetes, prevents recurrence of autoimmunity, and maintains insulin independence in 50% of the mice, when provided after syngeneic or allogeneic pancreatic islet transplantation. CT schedule and dosage was optimized to induce the CT-driven tolerogenic program prior to islet transplantation. By CT optimization we obtained stable normoglycemia in 100% of NOD mice with residual endogenous beta cell mass, which is sustained by Tregs, expanded in pancreatic infiltrates and lymph-nodes. Overall, results indicate that optimized CT represents a curative treatment for T1D, when associated with allogeneic islet transplantation to restore activity of the endogenous beta cell mass.

The model of Mucopolysaccharidosis I (IDUA-/-, MPS-1) is resistant to tolerance induction by LV.ET.142T, thus it represents a valuable model to test combined therapies to achieve stable gene correction. At the steady state we found an upregulation of several pro-inflammatory cytokines and chemokines in the sera of MPS-1 mice compared to wt age-matched control mice. Innate immune response triggered by LV favors the induction of the anti-transgene adaptive response. Thus, immunosuppressive drugs have been tested to abrogate pro-inflammatory signaling from innate-immunity cells in combination with the use of GP64-enveloped LV and co-expression of PDL-1, a T cell inhibitory co-stimulatory molecule. These strategies led to a significant reduction of T cell mediated IDUA-specific responses associated with increased T cell exhaustion in the liver.

La piattaforma LV.ET.142T è stata efficacemente applicata per la terapia genica dell'emofilia B o per promuovere/ripristinare la tolleranza antigene (Ag)-specifica nel diabete autoimmune (T1D), sostenendo il trasferimento genico mirato agli epatociti come una nuova strategia per indurre tolleranza immunologica.

Abbiamo dimostrato in precedenza che l'espressione LV mediata del frammento dell'insulina B 9-23 (LV.InsB) negli epatociti, arresta la distruzione delle cellule beta pancreatiche nei topi NOD allo stadio pre-diabetico avanzato, generando cellule T regolatorie InsB-specifiche (Tregs) (1). Abbiamo inoltre dimostrato che LV.InsB in combinazione con una dose sub-ottimale di anti-CD3 mAb (CT) cura il diabete, previene la ricomparsa di autoimmunità e mantiene l'indipendenza da insulina nel 50% dei topi, se fornito dopo trapianto di isole pancreatiche singeniche o allogeneiche. Ora attraverso una ottimizzazione della CT, inducendo il programma tollerogenico prima di trapiantare le isole, abbiamo ottenuto il ritorno ad una stabile normoglicemia nel 100% dei topi NOD, che avessero un residuo di cellule beta endogene. Complessivamente, i risultati indicano che la CT ottimizzata rappresenta un

trattamento curativo per T1D quando associato al trapianto di isole allogeniche per ripristinare l'attività delle cellule beta endogene.

Il modello di Mucopolisaccaridosi I (IDUA<sup>-/-</sup>, MPS-1) è resistente alla induzione di tolleranza con LV.ET.142T, quindi rappresenta un modello prezioso per testare terapie da combinare per ottenere una correzione genica stabile con LV. La risposta immunitaria innata innescata da LV favorisce l'induzione della risposta adattativa contro il transgene. Pertanto, abbiamo testato composti immunosoppressivi per abrogare l'azione pro-infiammatoria dalle cellule dell'immunità innata in combinazione con l'uso di GP64-LV e la co-espressione di PDL-1 ottenendo una significativa riduzione della risposta immune verso le cellule esprimenti IDUA transgenica.

1. Akbarpour M, Goudy KS, Cantore A, Russo F, Sanvito F, Naldini L, Annoni A, Roncarolo MG. Insulin B chain 9-23 gene transfer to hepatocytes protects from type 1 diabetes by inducing Ag-specific FoxP3<sup>+</sup> Tregs. *Sci Transl Med.* 2015 May 27;7(289):289ra81.

Diabete Tipo 1, Mucopolisaccaridosi tipo 1

Coordinator: Silvia Gregori

Partners: Cantore Alessio

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16G02

**Disease Name:**

Mucopolysaccharidosis I / Type 1 Diabetes

**Keywords:**

Liver-directed gene therapy, Ag-specific tolerance, Immune response to transgene

## Poster P.11.95

### POMPE DISEASE, NEW APPROACHES TO ADDRESS UNMET NEEDS

Parenti G.\*<sup>[1]</sup>, Tarallo A.<sup>[1]</sup>, Damiano C.<sup>[1]</sup>, Minopoli N.<sup>[1]</sup>, Strollo S.<sup>[1]</sup>, Gragnaniello V.<sup>[2]</sup>, Fecarotta S.<sup>[2]</sup>, Gatto F.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Translational Medical Sciences, Federico II University ~ Napoli ~ Italy

Pompe disease (PD) is a severe and progressive myopathy caused by mutations of the GAA gene and acid alpha-glucosidase (GAA) deficiency. PD is highly debilitating and impacts heavily on patients' health. Currently, the only treatment for PD is enzyme replacement therapy (ERT) with recombinant GAA (rhGAA). However, ERT shows limited efficacy in some patients and in critical target tissues, leaving major medical needs unmet. In our research programs we have addressed some of these needs. Specifically:

- need for improved knowledge of PD pathophysiology. Glycogen storage and impairment of autophagy are responsible for secondary abnormalities of cellular pathways that need further characterization. We studied oxidative stress as a consequence of impaired autophagy. We showed increased oxidative stress in PD patient cultured cells and in the animal model of the disease. Increased oxidative stress affects the uptake and processing of rhGAA and impacts on the efficacy of ERT. The characterization of secondary abnormalities of cellular pathways is particularly important since these pathways may represent novel therapeutic targets.

- need for reliable, measurable and objective disease markers. The availability of markers to monitor disease course and effects of treatment (including future novel therapies) is a challenging issue in the management and care of PD patients. Current clinical tests are often non-specific and are influenced by inter and intra-investigator variance. We identified circulating microRNAs (miR-133a, miR-1, miR-106), as quantitative and measurable biomarkers, significantly correlating with patient phenotype and with the effects of ERT [Tarallo et al, 2019].

- need for novel and more efficacious therapies and identification of novel therapeutic targets. We have conducted studies based on different approaches. First, we studied pharmacological chaperone therapy in PD, either alone, or in combination with ERT [Parenti et al, 2015]. This approach was translated into the first clinical trial based on this approach in a lysosomal disease. The combination of a chaperone and ERT resulted in highly and significantly increased exposure to the therapeutic enzyme in PD patients [Parenti et al, 2014]. We are currently evaluating the use of new, allosteric, non-inhibitory chaperones for GAA [Porto et al, 2012; Roig-Zamboni et al, 2017].

We also evaluated the possibility of manipulating pathways that are secondarily dysregulated in PD as a therapeutic strategy. We studied modulation of autophagy by TFEB overexpression. AAV- TFEB gene therapy improved muscle pathology, autophagy markers, and functional performance in PD mice [Gatto et al, 2017]. These results support the idea that progress in the treatment of PD, and possibly of other lysosomal diseases, should not only be based on the development of more effective therapeutic agents, but should also be directed towards correction of secondary abnormalities in recipient cells and tissues.

La malattia di Pompe, nuovi approcci per le problematiche irrisolte associate alla malattia

La malattia di Pompe è una grave miopatia progressiva causata da mutazioni del gene GAA e deficit di alfa-glucosidasi acida (GAA). Nonostante sia disponibile un trattamento per questa malattia, la terapia sostitutiva enzimatica (ERT) con GAA ricombinante (rhGAA), questa terapia non ha risolto tutti i problemi dei pazienti ed ha lasciato alcune problematiche ancora aperte ed irrisolte. Nei nostri programmi di ricerca abbiamo affrontato alcune di queste problematiche. In particolare:

- necessità di una migliore conoscenza dei meccanismi patogenetici alla base della malattia di Pompe. L'accumulo di glicogeno e la compromissione dell'autofagia sono ormai ben caratterizzati. L'alterazione di questi processi può però innescare ulteriori anomalie secondarie di altre funzioni cellulari. Una potenziale conseguenza della disfunzione dell'autofagia è un aumento dello stress ossidativo. In effetti abbiamo dimostrato l'aumento dello stress ossidativo nella malattia ed abbiamo osservato che questa alterazione può avere conseguenze negative sulla efficacia della ERT. La accurata caratterizzazione delle anomalie secondarie delle funzioni cellulari è particolarmente importante poiché queste vie possono rappresentare nuovi bersagli terapeutici.

- necessità di marcatori di malattie affidabili, misurabili e oggettivi. La disponibilità di strumenti per monitorare il decorso della malattia e gli effetti del trattamento (comprese eventuali future nuove terapie) è un aspetto di grande importanza nella gestione e nella cura dei pazienti con malattia di Pompe. Gli attuali test clinici sono spesso aspecifici e sono influenzati dalla esperienza dei medici che li utilizzano. Abbiamo identificato i microRNA circolanti, piccoli RNA non codificanti, come marcatori affidabili dello stato dei pazienti e degli effetti della terapia.

- necessità di nuove e più efficaci terapie e identificazione di nuovi target terapeutici. Abbiamo condotto studi basati su approcci diversi. Innanzitutto, abbiamo studiato la terapia con i cosiddetti farmaci "chaperone", sia da soli che in combinazione con la ERT. Gli studi in laboratorio sono stati tradotti nella prima sperimentazione clinica basata su questo approccio in una malattia lisosomiale e sono ora in fase di ulteriore sviluppo per rendere questa terapia disponibile ai pazienti. Stiamo attualmente valutando l'uso di nuovi farmaci "chaperone" identificati nel nostro laboratorio.

Abbiamo inoltre valutato la possibilità di manipolare sistemi cellulari secondariamente disregolati nella malattia di Pompe come strategia terapeutica aggiuntiva. Abbiamo studiato la modulazione dell'autofagia mediante sovraespressione del gene TFEB, che è un gene regolatore dell'autofagia. Questi studi sono stati condotti finora in laboratorio ed hanno mostrato un effetto positivo della sovraespressione di TFEB.

Tarallo A, Carissimo A, Gatto F, Nusco E, Toscano A, Musumeci O, Coletta M, Karali M, Acampora E, Damiano C, Minopoli N, Fecarotta S, Della Casa R, Mongini T, Vercelli L, Santoro L, Ruggiero L, Deodato F, Taurisano R, Bembi B, Dardis A, Banfi S, Pijnappel WWP, van der Ploeg AT, Parenti G. microRNAs as biomarkers in Pompe disease. *Genet Med*. 2019 Mar;21(3):591-600

Parenti G, Andria G, Valenzano KJ. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Mol Ther*. 2015 Jul;23(7):1138-1148

Parenti G, Fecarotta S, la Marca G, Rossi B, Ascione S, Donati MA, Morandi LO, Ravaglia S, Pichiecchio A, Ombrone D, Sacchini M, Pasanisi MB, De Filippi P, Danesino C, Della Casa R, Romano A, Mollica C, Rosa M, Agovino T, Nusco E, Porto C, Andria G. A chaperone enhances blood  $\alpha$ -glucosidase activity in Pompe disease patients treated with enzyme replacement therapy. *Mol Ther*. 2014 Nov;22(11):2004-12.

Porto C, Ferrara MC, Meli M, Acampora E, Avolio V, Rosa M, Cobucci-Ponzano B, Colombo G, Moracci M, Andria G, Parenti G. Pharmacological enhancement of  $\alpha$ -glucosidase by the allosteric chaperone N-acetylcysteine. *Mol Ther*. 2012 Dec;20(12):2201-11

Roig-Zamboni V, Cobucci-Ponzano B, Iacono R, Ferrara MC, Germany S, Bourne Y, Parenti G, Moracci M, Sulzenbacher G. Structure of human lysosomal acid  $\alpha$ -glucosidase-a guide for the treatment of Pompe disease. *Nat Commun*. 2017 Oct 24;8(1):1111

Gatto F, Rossi B, Tarallo A, Polishchuk E, Polishchuk R, Carrella A, Nusco E, Alvino FG, Iacobellis F, De Leonibus E, Auricchio A, Diez-Roux G, Ballabio A, Parenti G. AAV-mediated transcription factor EB (TFEB) gene delivery ameliorates muscle pathology and function in the murine model of Pompe Disease. *Sci Rep*. 2017 Nov 8;7(1):15089

Malattia di Pompe

Coordinator: Alberto Auricchio

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Pompe Disease

**Keywords:**

Pompe disease, microRNA, autophagy

## Poster P.11.96

### NOVEL THERAPIES FOR UREA CYCLE DISORDERS.

Soria L.<sup>[1]</sup>, De Angelis A.<sup>[1]</sup>, Paris P.<sup>[2]</sup>, Cuomo P.<sup>[2]</sup>, Motta A.<sup>[2]</sup>, Perocheau D.<sup>[3]</sup>, Orford M.<sup>[3]</sup>, Eaton S.<sup>[3]</sup>, Waddington S.<sup>[5]</sup>, Makris G.<sup>[4]</sup>, Baruteau J.<sup>[3]</sup>, Haeberle J.<sup>[4]</sup>, **Brunetti--Pierri N.\*<sup>[1]</sup>**

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute of Biomolecular Chemistry, National Research Council ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[3]</sup>Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London ~ London ~ United Kingdom, <sup>[4]</sup>Division of Metabolism, University Children's Hospital Zurich and Children's Research Center ~ Zurich ~ Switzerland, <sup>[5]</sup>Institute of Women's Health, University College London ~ London ~ United Kingdom

Urea cycle disorders (UCD) result from defects in the metabolism of waste nitrogen from the breakdown of proteins and other nitrogen-containing molecules. Deficiencies of urea cycle enzymes result in life-threatening hyperammonemia. Infants with severe UCD are normal at birth but rapidly develop neurologic symptoms leading to death if left untreated. Despite current available treatments, UCD and hyperammonemia remains a highly challenging condition that holds high risks of mortality and irreversible damage. More effective therapies for UCD are highly needed. Recently, we found that hepatic autophagy is activated by ammonia in vivo and serves as an important mechanism for ureagenesis and ammonia detoxification (Soria et al. PNAS 2019). In the present study, we investigated the efficacy of Tat-Beclin-1 (TB-1), a cell penetrating autophagy inducing peptide, in two mouse models of the two most common UCD, namely ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD) and argininosuccinate lyase deficiency (ASLD). Following treatments, we observed amelioration in survival, growth, and reduction in orotic acid and argininosuccinate which are the biochemical hallmarks of OTCD and ASLD, respectively. Importantly, we also detected increased ureagenesis by stable isotope study in both disease models following treatments with TB-1. In summary, these data confirm a key role of autophagy in nitrogen homeostasis and the efficacy of autophagy enhancer molecules for therapy of the two most common UCD.

I disordini del ciclo dell'urea (UCD) sono causati da difetti nel metabolismo dell'azoto derivante dalla degradazione delle proteine e di altri composti azotati. La deficienza di ciascuno degli enzimi del ciclo dell'urea provoca iperammonemia, una condizione potenzialmente letale. I bambini con UCD sono in genere normali alla nascita ma sviluppano rapidamente sintomi neurologici che portano alla morte se non trattati. Nonostante gli attuali trattamenti disponibili, UCD e iperammonemia restano condizioni mediche molto difficili da trattare con rischi elevati di mortalità e danni cerebrali irreversibili. E' pertanto necessario sviluppare terapie più efficaci per i UCD. Recentemente, abbiamo scoperto che l'autofagia epatica è attivata dall'ammonio in vivo e svolge un'importante funzione di supporto per la produzione di urea che permette la detossificazione dell'ammonio (Soria et al. PNAS 2019). In questo studio, abbiamo studiato l'efficacia del peptide Tat-Beclin-1 (TB-1) che penetra nelle cellule e stimola l'autofagia, nei modelli murini dei due più comuni UCD, ovvero il deficit di ornitina transcarbamilasi (OTCD) e il deficit di argininosuccinico liasi (ASLD). Il trattamento con questo peptide ha portato un miglioramento della sopravvivenza e la riduzione dell'acido orotico o dell'argininosuccinato, che sono rispettivamente i principali marcatori biochimici dell'OTCD e dell'ASLD. Inoltre, mediante studi con isotopi stabili, abbiamo osservato che il trattamento con TB-1 risulta in un aumento dell'ureagenesi in entrambi i modelli di malattia. In sintesi, questi dati preclinici confermano un ruolo chiave dell'autofagia nell'omeostasi dell'ammonio e confermano l'efficacia di farmaci che stimolano l'autofagia per la terapia dei due più comuni UCD.



1. Soria LR, Mew NA, Brunetti-Pierri N. Progress and challenges in development of new therapies for urea cycle disorders. *Hum Mol Genet.* 2019 Jun 22.
2. Soria LR, Brunetti-Pierri N. Ammonia and autophagy: An emerging relationship with implications for disorders with hyperammonemia. *J Inherit Metab Dis.* 2019 Jan 22.
3. Soria LR, Brunetti-Pierri N. Targeting autophagy for therapy of hyperammonemia. *Autophagy.* 2018;14(7):1273-1275.
4. Soria LR, Allegri G, Melck D, Pastore N, Annunziata P, Paris D, Polishchuk E, Nusco E, Thöny B, Motta A, Häberle J, Ballabio A, Brunetti-Pierri N. Enhancement of hepatic autophagy increases ureagenesis and protects against hyperammonemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jan 9;115(2):391-396.

Difetti del ciclo dell'urea

Coordinator: Nicola Brunetti-Pierri

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Urea Cycle Disorders

**Keywords:**

urea cycle disorders, autophagy, ureagenesis

## Poster P.11.97

### INTEGRATED APPROACHES TO GENE THERAPY OF WILSON DISEASE

Monti M., Padula A., Ferriero R., Piccolo P.\*

*Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy*

Wilson disease (WD) is a recessive inherited disorder caused by alterations in copper metabolism due to mutations in ATP7B, a P-type copper transporting ATPase. In WD, copper accumulates systemically and primarily in the liver, causing organ degeneration until cirrhosis, neurological and psychiatric deficits, and renal dysfunction. Therapies for WD are based on removal of copper deposits by chelating agents and reduction of copper intestinal absorption by zinc salts. Therapy is effective in most but not all WD patients and non-responders usually require liver transplantation. Moreover, current treatments often fail to ameliorate the neuropsychiatric symptoms. In patients responding to therapy compliance to treatments is often an issue given the drug side effects and duration of the treatment. WD represents an attractive target for liver-directed gene therapy and human ATP7B gene transfer to *Atp7b*<sup>-/-</sup> mouse liver have shown efficacy in correcting copper metabolism. Nevertheless, several hurdles remain toward the development of gene therapy for WD patients.

Full-length human ATP7B is too big to be accommodated in recombinant adeno-associated viral vectors (rAAVs), currently the vectors of choice for liver gene therapy. We are engineering human ATP7B by deleting domains that are not necessary for copper transport function, in order to generate optimized shorter human ATP7B that can fit in the rAAV genome and rescue the phenotype in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mouse model. To address human ATP7B size issue we are also using a novel dual vector approach which allows to split human ATP7B in two halves. Co-transduction of hepatocytes by both rAAV vectors bearing ATP7B halves will allow for full-length protein reconstitution.

WD often arises in children and adolescents and using episomal vectors like rAAVs for gene transfer in a growing liver may result in progressive dilution of the transgene and loss of therapeutic effect. We are exploring strategies to achieve safe targeted integration of the ATP7B sequences into a safe harbor locus and avoid transgene dilution, whilst allowing high levels of expression of the transgene in the liver.

In conclusion, we are developing novel approaches to overcome major hurdles toward effective liver-directed gene therapy for WD.

### APPROCCI INTEGRATI DI TERAPIA GENICA PER LA MALATTIA DI WILSON

La malattia di Wilson è una patologia ereditaria del metabolismo del rame causata da mutazioni nel gene ATP7B, che ha la funzione di favorire l'eliminazione del rame in eccesso dall'organismo. Nei pazienti colpiti dalla malattia, il rame si accumula in diversi organi ed in particolare a livello del cervello e del fegato, danneggiandolo fino all'insufficienza epatica. La terapia corrente non è efficace in tutti i pazienti ed è spesso associata ad importanti effetti collaterali. La terapia genica potrebbe dunque rappresentare una valida alternativa all'attuale trattamento. I vettori adeno-associati (AAV) sono ad oggi considerati i vettori di scelta per il trattamento delle patologie ereditarie del fegato e sono stati impiegati con successo nel trattamento di altre patologie ereditarie. L'obiettivo di questo progetto è quello di sviluppare approcci di terapia genica diretta al fegato per la malattia di Wilson mediante vettori AAV in un modello murino della patologia.

Una delle maggiori difficoltà relative allo sviluppo della terapia genica per la malattia di Wilson riguarda le dimensioni del gene ATP7B, troppo grandi per consentirne l'inserimento in vettori AAV. Per questo motivo stiamo testando varianti "corte" del gene ATP7B che, pur essendo prive di alcune parti, mantengano la funzione di trasporto del rame e possano essere inserite all'interno di vettori AAV. Una strategia alternativa consiste invece nel dividere ATP7B in due parti ed inserirle in due differenti vettori AAV: all'interno delle cellule bersaglio le due porzioni possono combinarsi tra loro e ricostituire la proteina intera e funzionale.

Un ulteriore approccio che stiamo sviluppando consiste nell'integrazione mirata di una copia del gene ATP7B nel genoma delle cellule epatiche, in una posizione tale da garantirne elevati livelli di espressione nel fegato. Essendo parte integrante del genoma, la copia corretta di ATP7B è stabilmente presente all'interno della cellula bersaglio e, in caso di duplicazione della cellula, viene ereditata dalle cellule figlie. Questo approccio presenta notevoli vantaggi per il trattamento di bambini ed adolescenti, nei quali il fegato è ancora in crescita, in quanto consentirebbe l'espressione a lungo termine del gene terapeutico.

Polishchuk et al., Dev Cell 2014

Murillo et al., J Hepatol 2016

Murillo et al., Hepatology 2019

Malattia di Wilson

Coordinator: Pasquale Piccolo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Wilson Disease

**Keywords:**

Wilson disease, Gene therapy, ATP7B

## 12\_Chromosomal anomaly

## Poster P.12.98

### **ANALYTICAL METHOD: VALIDATION AND ANALYSES OF STUDY SAMPLES**

Visigalli I., Francesca C., Vezzoli M., Hernandez J.R., De Simone M., Costantini R., Mauro V., Albertini P.\*

*San Raffaele Scientific Institute, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ milano ~ Italy*

Analytical results of preclinical studies and of clinical trials are used to support the safety and efficacy of a medicinal drug substance or product. It is therefore paramount that the applied bioanalytical methods used are well characterised, fully validated and documented to a satisfactory standard in order to yield reliable results. The validation process includes:

- Definition of the analytical requirements and their acceptance criteria
- proper documented evidence through the use of specific laboratory investigations
- proper performance parameters of the tested method
- confirmation of the method's suitability so that the method under consideration is fit-for-purpose.

It is strongly recommended that a method is validated prior to application to studies.

The validation parameters and which subset of each parameter is required to demonstrate validity are based on the method's intended use. Therefore, the validation of each assay or test method is performed on a case-by-case basis. If a method supersedes or is being analysed in parallel with another method for the same analyte, a correlation of the two methods must be performed. In case of analyses performed by different laboratories, Inter-laboratory comparison should be performed in order to compare performance among different laboratories. So never assume that method is fit for purpose if this is not verified and documentation of such verification is not available.

After validation of the analytical method, analysis of pre-clinical study or subject samples can be carried out, according to the validation results. Analysis data may only be excluded where it can be demonstrated through sound science that the data is anomalous or non-representative. In all cases, this justification should be documented and considered during data review and reporting. All data (even if excluded) should be retained with the original data set, and be available for review in a format that allows the validity of the decision to exclude the data to be confirmed.

Repetition of analyses is necessary if internal controls fail or in case of analytical equipment malfunctions. Repetition may be needed also when Sample from a control group shows the presence of drug. It is never acceptable to selectively report data; consequently, the rationale and the process for the repeat analysis as well as the acceptance criteria should be transparent and documented.

Examples of analytical results obtained applying validated methods and some examples of data malpractice will be presented.

Metodo analitico: convalida e analisi di campioni di studio

I risultati analitici ottenuti dagli studi preclinici e studi clinici sono utilizzati per supportare la sicurezza e l'efficacia di una sostanza o di un prodotto medicinale. È quindi fondamentale che i metodi bioanalitici utilizzati nelle analisi siano ben caratterizzati, pienamente validati e documentati secondo uno standard soddisfacente al fine di ottenere risultati affidabili. Il processo di convalida comprende:

- Definizione dei requisiti analitici e dei loro criteri di accettabilità
- test adeguatamente documentati mediante l'uso di analisi di laboratorio specifiche
- adeguati parametri di performance del metodo testato
- conferma dell'idoneità del metodo in modo che il metodo in esame sia idoneo allo scopo.

E' fortemente raccomandato convalidare un metodo prima della sua applicazione nelle analisi degli studi.

I parametri di convalida e il sottoinsieme di ciascun parametro necessario per dimostrarne la validità si basano sull'uso previsto del metodo stesso. Pertanto, la convalida di ciascun saggio o metodo di prova viene definita caso per caso. Se per lo stesso analita un metodo sostituisce o viene analizzato in parallelo con un altro metodo, è necessario eseguire una correlazione dei due metodi. Nel caso di analisi eseguite da diversi laboratori, è necessario eseguire un confronto inter-laboratorio al fine di confrontare le prestazioni tra diversi laboratori. Quindi è necessario non dare mai per scontato che il metodo sia adatto allo scopo se questo non è verificato e la documentazione di tale verifica non è disponibile.

Dopo la convalida del metodo analitico, è possibile eseguire analisi di campioni di studio preclinico o di soggetto, in base ai risultati della convalida. I dati di analisi possono essere esclusi solo laddove si possa dimostrare attraverso una solida scienza che i dati sono anomali o non rappresentativi. In tutti i casi, questa giustificazione deve essere documentata e considerata durante la revisione e la comunicazione dei dati. Tutti i dati (anche se esclusi) devono essere conservati con il set di dati originale ed essere disponibili per la revisione in un formato che consenta di confermare la validità della decisione di escludere i dati.

La ripetizione delle analisi è necessaria se i controlli interni falliscono o in caso di malfunzionamenti delle apparecchiature analitiche. La ripetizione può essere necessaria anche quando il campione di un gruppo di controllo mostra la presenza di sostanza. Non è mai accettabile riportare i dati in modo selettivo; di conseguenza, il rationale e il processo di ripetizione dell'analisi nonché i criteri di accettazione dovrebbero essere trasparenti e documentati.

Verranno presentati esempi di risultati analitici ottenuti applicando metodi validati e alcuni esempi di malpratica nella gestione di dati analitici.

1. OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17
2. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Centre for Veterinary Medicine (CVM), May 2001 [5]
3. T. Little, Method Validation Essentials, Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. BioPharm International, 28 (4) 2015.
4. Guideline on Bioanalytical Method Validation , Committee for Medical Products for Human use (CHMP), European Medicines Agency (EMA), EMA/CHMP/EWP/ 192217/2009, 21 July 2011
5. Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: II assays. Journal of Immunological Methods 363 (2011) 120–134

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

TIGET

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**



## 13\_Genetic bone disease



## Poster P.13.99

### **AUTOSOMAL DOMINANT OSTEOPETROSIS TYPE 2 (ADO2): CLOSE TO THE CURE. WHAT DO WE MISS?**

Maurizi A., Rucci N., Teti A.M.\*

*Università dell'Aquila ~ L'Aquila ~ Italy*

Autosomal Dominant Osteopetrosis type 2 (ADO2) is a bone disease with high morbidity, but generally with a normal life expectancy. Patients manifest fragile bones prone to multiple fractures. The cells principally implicated in the disease are the bone resorbing osteoclasts, which remove the old and damaged bone that will then be replaced by new and healthy bone matrix. The impaired osteoclast activity prevents the enlargement of the bone cavities that lodge important tissues, such as the bone marrow and the nerves, causing hematological failures and motor-sensorial impairments (1). Furthermore, ADO2 disrupts also the activity of other cell types, therefore it should currently be considered a systemic disease rather than a bone disease only (2). Unfortunately, ADO2 has no cure and patients are treated only palliatively to stabilise fractures, reduce pain and cure anemia and infections. The aim of this project is to advance an innovative siRNA therapy for ADO2 proven in our laboratory to be specific, effective and safe in ADO2 mice (2-4). This therapy targets the heterozygous mutant gene, CLCN7, silencing the diseased mRNA without affecting the normal mRNA, thus rescuing the normal phenotype because of CLCN7 haplosufficiency. The gap to be filled to progress towards the regulatory toxicity studies, mandatory to gain the authorization to perform Phase I/II clinical trials, is to develop a clinically testable delivery system. The project will focus on the Clcn7G213R siRNA (CLCN7G215R siRNA in humans), that we have already extensively tested in our ADO2 mouse model. Options consist in 1) chemical modifications of the siRNA, 2) complexation of the siRNA with polyethylenimine (PEI) derivative nanoparticles and 3) encapsulation of the siRNA in proteic or lipidic nanoparticles. All options are aimed at improving systemic delivery, siRNA stability, biodistribution, pharmacokinetics and cellular uptake. Options will be investigated in vitro and those with the best specificity, efficacy and cellular safety will be tested in vivo in ADO2 mice, performing phenotypic and toxicity studies. The selected final formulation(s) will be suitable for Good Manufacturing Practice (GMP) and will allow to progress towards the regulatory Good Laboratory Practice (GLP) toxicity studies to be performed beyond the duration of the project. The therapy is patented. Therefore, we are in the position to move it to the clinic through industrial partnership, which is the final long-term goal of our project. Should this process be successful, this would be the very first targeted therapy for a disease with high morbidity and no cure.

### **OSTEPETROSI AUTOSOMICA DOMINANTE DI TIPO 2 (ADO2): PROSSIMI ALLA CURA. COSA MANCA?**

L'ADO2 è una malattia delle ossa fortemente debilitante, caratterizzata da ossa molto dense e fragili, che possono fratturarsi numerose volte. Le cellule implicate nell'ADO2 sono gli osteoclasti ed hanno il compito di erodere l'osso da eliminare per essere sostituito da osso nuovo che consente la stabilità dello scheletro. La riduzione dell'attività osteoclastica non crea spazio sufficiente per lo sviluppo normale del midollo osseo e per l'ampliamento dei canali neuronali, inducendo alterazioni ematologiche e moto-sensoriali (1). L'ADO2 coinvolge anche altri tipi cellulari e dovrebbe essere considerata una malattia sistemica (2). Non esistono cure per l'ADO2 ed i pazienti ricevono solo

trattamenti palliativi. Lo scopo di questo progetto è di far progredire una terapia dell'ADO2 basata su una molecola chiamata siRNA, da noi inventata (3), specifica, efficace e non tossica in topi affetti dalla malattia (2-4). Essa colpisce il gene mutato nell'ADO2, chiamato CLCN7, distruggendo la molecola malata senza modificare quella sana, ripristinando quindi una condizione di normalità in seguito al fatto che nell'ADO2 solo una copia del gene è alterata, mentre l'altra è normale e sufficiente per svolgere le funzioni proprie della corrispondente proteina (1,4). Ciò che manca per progredire verso studi regolatori preclinici di tossicità, propedeutici all'autorizzazione per gli studi clinici di fase I/II, è lo sviluppo di formulazioni farmacologiche di grado clinico. Il progetto sarà incentrato su un siRNA per la mutazione Clcn7G213R (CLCN7G215R nell'uomo) che abbiamo già testato nel nostro modello murino di ADO2. Le nostre opzioni sono: 1) modificazioni chimiche del siRNA, 2) formulazione di complessi del siRNA con nanoparticelle di polietilenimina (PEI) e 3) inserimento del siRNA in nanoparticelle proteiche o lipidiche. Lo scopo è di migliorare l'invio del siRNA agli organi specifici e la sua stabilità, biodistribuzione, farmacocinetica ed internalizzazione nelle cellule. Le formulazioni saranno studiate in cellule in vitro e quelle migliori saranno testate in vivo nei topi ADO2, nei quali eseguiremo studi fenotipici e tossicologici. La formulazione finale selezionata al termine del progetto dovrà poi essere preparata secondo le regole della Good Manufacturing Practice (GMP) che consentiranno di progredire verso gli studi tossicologici regolatori che dovranno essere conformi alle regole della Good Laboratory Practice (GLP) ed eseguiti al termine del presente progetto. Questa terapia è stata brevettata, quindi abbiamo la possibilità di stabilire un partenariato industriale che consenta il suo sviluppo clinico, scopo finale a lungo-termine del nostro progetto. Se questo obiettivo dovesse essere raggiunto, quella da noi inventata sarebbe la prima vera terapia specifica per l'ADO2, una malattia con elevata morbosità ed attualmente senza alcuna cura.

1. Teti A, Econs MJ. Osteopetroses, emphasizing potential approaches to treatment. *Bone*. 2017 Sep;102:50-59. doi: 10.1016/j.bone.2017.02.002.
2. Capulli M, Maurizi A, Ventura L, Rucci N, Teti A. Effective Small Interfering RNA Therapy to Treat CLCN7-dependent Autosomal Dominant Osteopetrosis Type 2. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep 1;4:e248. doi: 10.1038/mtna.2015.21.
3. Maurizi A, Capulli M, Patel R, Curle A, Rucci N, Teti A. RNA interference therapy for autosomal dominant osteopetrosis type 2. Towards the preclinical development. *Bone*. 2018 May;110:343-354. doi: 10.1016/j.bone.2018.02.031
4. Maurizi A, Capulli M, Curle A, Patel R, Ucci A, Alves Cortes J, Oxford H, Lamande SR, Bateman JF, Rucci N, Teti A. Extra-skeletal manifestations in mice affected by Clcn7-dependent Autosomal Dominant Osteopetrosis Type 2. Clinical and therapeutic implications. *Bone Res*. 2019 Jun 11;7:17 doi: 10.1038/s41413-019-0055-x

Osteopetrosi Autosomica Dominante di tipo 2

Coordinator: Anna Maria Teti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19031

**Disease Name:**

Autosomal Dominant Osteopetrosis Type 2

**Keywords:**

Osteopetrosi Autosomica Dominante di tipo 2, Osteoclasti, siRNA

## Poster P.13.100

### EXPANDED CIRCULATING HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS AS A NOVEL CELL SOURCE FOR THE TREATMENT OF AUTOSOMAL RECESSIVE OSTEOPETROSIS

**Penna S.**<sup>[1]</sup>, Capo V.<sup>[1]</sup>, Merelli I.<sup>[2]</sup>, Barcella M.<sup>[1]</sup>, Scala S.<sup>[1]</sup>, Basso--Ricci L.<sup>[1]</sup>, Draghici E.<sup>[1]</sup>, Sergi Sergi L.<sup>[1]</sup>, Palagano E.<sup>[3]</sup>, Zonari E.<sup>[1]</sup>, Desantis G.<sup>[1]</sup>, Uva P.<sup>[4]</sup>, Cusano R.<sup>[4]</sup>, Fontana E.<sup>[3]</sup>, Crisafulli L.<sup>[3]</sup>, Mantero S.<sup>[3]</sup>, Schinke T.<sup>[5]</sup>, Scanziani E.<sup>[6]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>, Ficara F.<sup>[3]</sup>, Sobacchi C.<sup>[3]</sup>, Gentner B.<sup>[1]</sup>, Villa A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute for Biomedical Technologies, National Research Council ~ Segrate ~ Italy, <sup>[3]</sup>CNR-IRGB, Milan Unit ~ Milan ~ Italy, <sup>[4]</sup>CRS4, Science and Technology Park Polaris ~ Pula ~ Italy, <sup>[5]</sup>Institut für Osteologie und Biomechanik ~ Hamburg ~ Germany, <sup>[6]</sup>Department of Veterinary Medicine ~ Milan ~ Italy

Autosomal recessive osteopetrosis (ARO) is a rare genetic disease, affecting osteoclast differentiation or function. The majority of ARO patients (55%) presents mutations in TCIRG1 gene, encoding the  $\alpha 3$  subunit of V-ATPase proton pump, necessary for bone resorption. Osteoclast dysfunction results in limited bone marrow cavity and increased number of circulating CD34+ cells in patients. Symptoms include dense and brittle bones, anaemia and progressive nerve compression, leading to death in the first decade of life<sup>1,2</sup>. To date, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the treatment of choice, but its applicability is limited by availability of HLA-matched donor, toxicity of conditioning regimens and significant transplant-related morbidity<sup>3–6</sup>. Gene therapy (GT) may represent an alternative therapeutic option for these patients. We generated two lentiviral vectors (LVs), driving TCIRG1 expression under the control of the phosphoglycerate kinase promoter, with or without the dNGFR marker gene. We tested our GT protocol on the oc/oc murine model<sup>7</sup>, recapitulating the human disease. We transduced Tcirtg1-mutated Lin- cells, that showed the rescue of osteoclasts resorptive function upon in vitro differentiation. Transduced Lin- cells were also injected intra-liver into irradiated oc/oc newborn mice. The untreated oc/oc mice have a life expectancy of two weeks, conversely GT mice were sacrificed four months after GT, showing absence of circling behaviour, amelioration of bone architecture and reduced parathyroid hormone level in the serum. Furthermore, we observed the reorganization of white and red pulp of the spleen by histological analysis. In parallel, we exploited circulating CD34+ cells as a novel cell source for autologous transplantation of gene corrected cells. We observed that CD34+ cells, circulating at high frequency in the peripheral blood of TCIRG1-deficient patients, have a cellular composition that resembles bone marrow. To overcome the unfeasibility of bone marrow harvest/ HSPC mobilization and limit serial blood drawings, we applied UM171-based ex-vivo expansion of HSPCs<sup>8</sup> coupled with lentiviral gene transfer. Circulating CD34+ cells from TCIRG1-defective patients were transduced with LVs and expanded ex vivo. Expanded cells maintained long-term engraftment capacity and multi-lineage repopulating potential when transplanted in vivo both in primary and secondary NSG recipients. Moreover, when CD34+ cells were differentiated in vitro, we observed the formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts from both transduced and untransduced CD34+ cells, as expected. Bone resorption capacity was restored only in cells transduced with corrective LVs. Overall, we provide evidence that expansion of circulating HSPCs coupled to gene therapy could represent a feasible, readily available treatment for ARO patient, thus opening the way to future gene-based treatment of skeletal diseases caused by bone marrow fibrosis.

## ESPANSIONE DELLE CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE PER UN INNOVATIVO TRATTAMENTO DELL'OSTEOPETROSI AUTOSOMICA RECESSIVA

L'osteopetrosi autosomica recessiva (ARO) è causata da difetti del differenziamento o della funzionalità degli osteoclasti e conduce alla morte nei primi anni di vita. Circa il 55% dei pazienti presentano mutazioni nel gene TCIRG1, necessario per il riassorbimento osseo. Il difetto osteoclastico causa la riduzione delle cavità midollari e un aumento delle cellule CD34+ circolanti in periferia. I sintomi della malattia includono ossa dense e fragili, anemia e compressione dei nervi cranici. Ad oggi il trattamento standard è il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSPC), il cui successo è limitato dalla presenza di donatori compatibili, dalla tossicità del condizionamento e dalla mortalità correlata alla procedura. La terapia genica, quindi, rappresenta una valida alternativa per questi pazienti. Abbiamo sviluppato due vettori lentivirali che esprimono il gene TCIRG1. Abbiamo testato il protocollo di terapia genica nel modello murino oc/oc, che ricapitola la malattia. In seguito alla correzione genica abbiamo osservato il recupero della funzionalità degli osteoclasti in vitro. In vivo le cellule trasdotte hanno consentito la sopravvivenza dei topi oc/oc, irradiati e trattati con iniezione intraepatica, fino a 4 mesi post-terapia. A differenza dei topi non trattati che hanno un'aspettativa di vita di 2 settimane, i topi trattati con terapia genica mostrano miglioramento dell'architettura scheletrica, ridotti livelli di ormone paratiroideo nel siero e riorganizzazione della polpa rossa e bianca della milza. In parallelo, abbiamo studiato le cellule CD34+ circolanti come nuova fonte di HSPC per la terapia genica, in quanto i pazienti ARO sono caratterizzati da un elevato numero di cellule CD34+ nel sangue periferico. L'analisi approfondita delle popolazioni ematopoietiche evidenzia una forte somiglianza con la composizione del midollo osseo. Poiché il prelievo di midollo osseo o la mobilizzazione di HSPC non possono essere effettuati nei pazienti con osteopetrosi, abbiamo trasdotto le cellule CD34+ con i vettori lentivirali e poi applicato un protocollo di espansione delle HSPC ex vivo. Le cellule manipolate hanno mantenuto la capacità di attecchire a lungo termine e di ricostituire le sottopopolazioni ematopoietiche nei topi immunodeficienti. Inoltre, le cellule CD34+ hanno mostrato la capacità di differenziare in osteoclasti in grado di riassorbire dischetti di osso in vitro. In conclusione, abbiamo dimostrato che la terapia genica e l'espansione delle HSPC rappresentano un protocollo utilizzabile per la cura dell'osteopetrosi. Tale terapia rappresenta una nuova opportunità terapeutica per il trattamento mediante terapia genica di patologie scheletriche caratterizzate da fibrosi del midollo osseo.

1. Villa A, Guerrini MM, Cassani B, Pangrazio A, Sobacchi C. Infantile malignant, autosomal recessive osteopetrosis: the rich and the poor. *Calcif. Tissue Int.* 2009;84(1):1–12.
2. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013;9(9):522–536.
3. Stepensky P, Grisariu S, Avni B, et al. Stem cell transplantation for osteopetrosis in patients beyond the age of 5 years. *Blood Adv.* 2019;3(6):862–868.
4. Steward CG. Hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis. *Pediatr. Clin. North Am.* 2010;57(1):171–80.
5. Orchard PJ, Fasth AL, Le Rademacher J, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for infantile osteopetrosis. *Blood.* 2015;126(2):270–276.
6. Schulz AS, Moshous D, Steward CG, Villa A, Sobacchi C. Osteopetrosis. Consensus guidelines for diagnosis, therapy and follow-up. *ESID - EBMT WP Inborn Errors.* 2015;1–35.
7. Scimeca JC, Quincey D, Parrinello H, et al. Novel mutations in the TCIRG1 gene encoding the  $\alpha 3$  subunit of the vacuolar proton pump in patients affected by infantile malignant osteopetrosis. *Hum. Mutat.* 2003;21(2):151–157.
8. Zonari E, Desantis G, Petrillo C, et al. Efficient Ex Vivo Engineering and Expansion of Highly

Purified Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations for Gene Therapy. Stem Cell Reports. 2017;8(4):977–990.

Osteopetrosi Autosomica Recessiva

Coordinator: Anna Villa

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16C05

**Disease Name:**

Autosomal Recessive Osteopetrosis

**Keywords:**

Gene therapy, Osteopetrosis, Lentiviral vectors

## Poster P.13.101

### EMERGING ROLES OF ER-PHAGY IN MAINTAINING CELLULAR FITNESS AND FUNCTION IN CHONDROCYTES

De Leonibus C. <sup>[2]</sup>, Cinque L.<sup>[1]</sup>, Barolomeo R.<sup>[1]</sup>, Forrester A.<sup>[1]</sup>, Settembre C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Napoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>~ Italy

The endoplasmic reticulum (ER) is the largest cellular organelle playing different functions, from calcium storage to protein biosynthesis. Protein misfolding eventually occurs in the ER and leads to ER dysfunction, representing a primary pathogenic mechanism in multiple human disorders. Mammals have developed quality control mechanisms at the ER. The best characterized is the ER-associated degradation (ERAD), through which misfolded proteins translocate from the ER to the cytosol being proteasomally degraded. However, novel lysosomal pathways are emerging for ER quality control. The lysosome is a main hub for cellular clearance for the degradation of cytosolic substrates including proteins and organelles. ER-phagy is a novel identified pathway targeting ER portions via autophagy for lysosomal degradation. It is a critical regulator of ER homeostasis, content and function through ER-phagy receptors, ER-resident proteins with the ability to bind autophagosomal LC3 protein via a cytosolic LC3 interacting domain. Among them, FAM134B protein has emerged as the first and better characterized.

Chondrocytes represent highly secretory cells with an abundant ER, producing predominantly procollagen (PC) in the extracellular matrix during endochondral ossification. They reside in a poorly vascularized tissue as the growth plate with scarcity of nutrients, representing a good cellular model to study ER-phagy. We and others have shown that the lack of autophagy leads to PC accumulation in the ER, ER dysfunction and impaired bone growth. Moreover, defects in lysosomal hydrolases cause lysosomal storage diseases (LSDs), in which bone growth retardation is one of the main clinical feature. In LSD chondrocytes, the block in autophagy flux is associated to a failure in collagen secretion, whereas the stimulation of autophagy in LSD mouse models restores collagen levels in cartilage and ameliorates the bone phenotype.

Further work in our lab has led different lines of evidence underlying the physiological importance of ER-phagy in cellular health. Firstly, FAM134B-mediated ER phagy serves as a selective clearing mechanism for misfolded PC that otherwise accumulates in the ER, together in complex with the ER chaperone Calnexin. Secondly, ER-phagy has emerged as a transcriptionally induced mechanism during starvation and differentiation in chondrocytes, with the induction of FAM134B by the MiT/TFE transcription factors and a concomitant inhibition of the PI3K-PKB/Akt/mTORC1 signalling pathway. Third, the lack of FAM134B and of the other FAM134 family members, along with silencing of PC, an ER-phagy cargo, determines important effects in the fine regulation of cellular signaling including mTORC1 kinase activity and cellular metabolism.

Taken together, these data unveil a role for autophagy and ER-phagy in maintain cellular fitness in chondrocytes and suggest potential therapeutic approaches for the treatment of skeletal features in multiple human diseases.

Ruoli Emergenti di ER-phagy nel mantenimento del benessere cellulare in condrociti

Il reticolo endoplasmatico (ER) e' il piu' grande organello nella cellula con diverse funzioni cellulari:

dallo storage di calcio alla sintesi proteica. Durante la sintesi proteica, alcune proteine possono avere un alterato ripiegamento nell'ER, causando ER stress e una disfunzione dell'organello. I mammiferi hanno sviluppato meccanismi di controllo al livello dell'ER. La 'ER-associated degradation' (ERAD) rappresenta il pathway meglio caratterizzato, in cui le proteine mal ripiegate traslocano dall'ER al citosol e vengono degradate dal proteasoma. Tuttavia, esistono nuovi meccanismi lisosomiali di controllo al livello dell'ER. Il lisosoma e' il principale organello di degradazione di substrati citosolici. La 'ER-phagy' e' un nuovo pathway identificato in cui porzioni dell'ER vengono trasportate ai lisosomi per degradazione attraverso l'autofagia. La ER-phagy regola la omeostasi dell'ER attraverso recettori selettivi, ossia proteine residenti all'ER contenenti un dominio LIR che ha la capacita' di legare LC3 a livello degli autofagosomi. Tra essi, FAM134B rappresenta il recettore meglio caratterizzato.

I condrociti sono cellule molto secernenti con abbondante ER, e producono prevalentemente procollagene (PC) nella matrice extracellulare durante l'ossificazione endocondrale. Risiedono nella cartilagine di accrescimento, un tessuto poco vascolarizzato e povero di nutrienti, rappresentando percio' un buon modello cellulare per studiare la ER-phagy. E' stato dimostrato in precedenza che la mancanza di autofagia comporta un accumulo di PC al livello dell'ER, disfunzione dell'ER e alterato accrescimento osseo (1). Inoltre, difetti di idrolasi lisosomiali causano malattie da accumulo lisosomiale (LSD), in cui il ritardo di accrescimento osseo e' uno dei segni clinici principali. Nei condrociti modelli di LSD, il blocco dell'autofagia si associa ad una alterata secrezione di collagene, mentre la stimolazione dell'autofagia in modelli murini di LSD migliora i livelli di collagene nella cartilagine ed il fenotipo scheletrico (2).

Lavori piu' recenti nel nostro laboratorio hanno portato nuove linee di evidenza che sottolineano l'importanza dell'ER-phagy nel mantenimento del benessere cellulare. Primo, la ER-phagy attraverso FAM134B e' coinvolta nella rimozione del PC mal ripiegato che altrimenti si accumula all'ER (3). Secondo, la ER-phagy e' un meccanismo indotto trascrizionalmente durante condizioni di stress cellulare e differenziamento. Terzo, l'assenza di FAM134B o il silenziamento del PC, un substrato di ER-phagy, determina effetti importanti nella regolazione del signaling (es. mTORC1) e metabolismo cellulari.

In conclusione, questi dati evidenziano il ruolo dell'autofagia ed ER-phagy nel mantenimento del benessere cellulare nei condrociti, suggerendo un potenziale approccio terapeutico per il trattamento dei disturbi scheletrici in molteplici malattie umane.

1. Cinque L, et al. Nature 2015; 528(7581):272-5.
2. Bartolomeo R, et al. JCI 2017; 127(10):3717-3729.
3. Forrester A, et al. EMBO J; 38(2). pii: e99847.

Condrodisplasie

Coordinator: Carmine Settembre

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Chondrodysplasias



**Keywords:**

ER-phagy, Autophagy, Chondrocytes

## Poster P.13.102

### **PROTEOSTASIS IN THE EARLY SECRETORY COMPARTMENT AS A PATHOGENETIC MECHANISM AND THERAPEUTIC TARGET: ALTERED COLLAGEN BIOSYNTHESIS AND BONE DEVELOPMENT IN THE ABSENCE OF ERP44, A ZINC-REGULATED CHAPERONE**

Anelli T., Orsi A., Sorrentino I., Tempio T., Yoboue E., Sitia R.\*

*UniSR ~ Milan ~ Italy*

The pathogenesis of most genetic diseases generally entails defects in protein synthesis, transport and homeostasis. In many cases, mutations in the protein to be transported (cargo) impede its arrival to the final destination. In others, the genetic defect lies in one of the factors that orchestrate the intracellular transport of macromolecules. A prototypic example is Multiple coagulation deficiency, a condition caused by mutations in *LMAN1*, a gene encoding a lectin (*ERGIC53*) that promotes the secretion of clotting factors 5 and 8 and IgM. We investigate the pathophysiology of protein secretion and the mechanisms that maintain redox homeostasis in and between cells. In this project, we focused on ERp44, a folding assistant that interacts with *ERGIC53* and colocalizes with it in the early secretory compartment, coupling protein quality control with redox and calcium signaling in a pH-regulated manner (Anelli and Sitia, 2008; Vavassori et al., 2013; Watanabe et al., 2017).

To further investigate its pathophysiological roles, we generated additional cellular and animal models. Reconstituting KO or KD cells with a panel of mutants, we discovered that ERp44 binds and is regulated by zinc (Watanabe et al., 2019). ERp44 determines the localization and function of ERAP1 and other zinc-containing secretory enzymes. Zinc depletion (obtained by specific chelators or by silencing Golgi-resident ZnT transporters) inhibits ERp44 movements and functions. Cycling rapidly between the ER and Golgi with *ERGIC53* and KDEL receptors (Tempio et al., submitted), ERp44 controls the homeostasis and distribution of zinc in the secretory compartment.

At the organismic level, the majority of ERp44 KO mice are embryonically lethal. The few animals that survive are much smaller than their control littermates. Images obtained by TAC, MRI and immunohistochemistry reveal skeleton malformations at the level of the spinal column and skull, retarded bone growth, striking differences in the development and growth of long bones (femur and tibia), and reduced dimension of collagen fibers in tendons. The serum levels of zinc and alkaline phosphatase activity are altered in KO mice, suggesting that ERp44 controls collagen biogenesis and bone development, possibly modulating zinc homeostasis.

Ancor più che le grandi città, le nostre cellule sono incredibilmente affollate. Esse sono divise in compartimenti specializzati in particolari funzioni, che chiamiamo organuli. Ad esempio, i mitocondri producono energia, mentre i lisosomi sono sorte di isole ecologiche, che degradano in materiale danneggiato o in eccesso e lo riciclano immediatamente. Per il corretto funzionamento della cellula i miliardi di molecole che le compongono devono raggiungere il loro luogo di lavoro. Ogni tanto, le cose non vanno bene e si formano ingorghi: l'assenza o il ritardato arrivo di una proteina causano gravissime malattie.

Il nostro laboratorio studia i meccanismi che governano il traffico delle proteine nelle cellule, con particolare attenzione alle proteine destinate all'esportazione. Queste sono i principali mezzi di comunicazione tra cellule. In precedenza, abbiamo contribuito a comprendere come l'assenza di un controllore del traffico chiamato *LMAN1* causi un rallentato trasporto di certi anticorpi e di due fattori

della coagulazione in una forma di emofilia. Recentemente, abbiamo studiato ERp44, un controllore specializzato nella produzione di proteine molto complesse. Una di queste è il collagene, elemento essenziale in tendini e ossa. Quando ERp44 manca scheletro e tendini si sviluppano male. I topolini che ne sono privi ci stanno rivelando l'esistenza di alcuni meccanismi compensatori. Stiamo ora stiamo studiando questi meccanismi per poterli modulare nella speranza di identificare bersagli farmacologici.

Watanabe S, Amagai Y, Sannino S, Tempio T, Anelli T, Harayama M, Masui S, Sorrentino I, Yamada M, Sitia R§, Inaba K§. 2019 Zinc regulates ERp44-dependent protein quality control in the early secretory pathway. *Nat Commun.* 10:603. § joint last authors

Bestetti S, Medraño-Fernandez I, Galli M, Ghitti M, Bienert GP, Musco G, Orsi A, Rubartelli A and Sitia R, 2018 A persulfidation-based mechanism controls aquaporin-8 conductance *Science Adv.* 4:eaar5770

Vitale M, Bakunts A, Orsi A, Lari F, Tadè L, Danieli A, Rato C, Valetti C, Sitia R, Raimondi A, Christianson JC, van Anken E. 2019 Inadequate BiP availability defines endoplasmic reticulum stress. *E-life.* Mar 14;8. pii: e41168.

Bakunts A, Orsi A, Vitale M, Cattaneo A, Lari F, Tadè L, Sitia R, Raimondi A, Bachi A, van Anken E. 2017 Ratiometric sensing of BiP-client versus BiP levels by the unfolded protein response determines its signaling amplitude. *E-life* e27518. doi: 10.7554/eLife.27518

Pasalic D, Weber B, Giannone C, Anelli T, Müller R, Fagioli C, Felkl M, John C, Mossuto MF, Becker CFW, Sitia R, Buchner J. 2017 A peptide extension dictates IgM assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 10;114(41):E8575-E8584. doi: 10.1073/pnas.1701797114. Epub 2017 Sep 27.

Yoboue ED, Rimessi A, Anelli T, Pinton P, Sitia R. 2017 Regulation of Calcium Fluxes by GPX8, a Type-II Transmembrane Peroxidase Enriched at the Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane. *Antioxid Redox Signal.* 27(9):583-595. doi: 10.1089/ars.2016.6866. Epub 2017 Apr 17.

Sindrome di Ehlers-Danlos

Coordinator: Roberto Sitia

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP15059

**Disease Name:**

Ehlers Danlos Disease

**Keywords:**

protein quality control, collagen biosynthesis, zinc homeostasis

## Poster P.13.103

### FIBROUS DYSPLASIA: A ROADMAP TO TREATMENT ENABLED BY DISCOVERY OF UNPREDICTED MECHANISMS IN FIRST-IN CLASS MOUSE MODELS.

Remoli C.<sup>[1]</sup>, Palmisano B.<sup>[1]</sup>, Labella R.<sup>[1]</sup>, Donsante S.<sup>[1]</sup>, Di Filippo A.<sup>[1]</sup>, Persichetti A.<sup>[1]</sup>, Coletta I.<sup>[1]</sup>, Spica E.<sup>[1]</sup>, Saggio I.<sup>[2]</sup>, Robey P.<sup>[3]</sup>, Corsi A.<sup>[1]</sup>, Riminucci M.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome ~ Rome ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dept of Biology and Biotechnology "C Darwin" Sapienza University ~ Rome ~ Italy, <sup>[3]</sup>Skeletal Biology Section, NICDR, NIH ~ Bethesda ~ United States of America

Fibrous Dysplasia /McCune-Albright Syndrome (FD/MAS, OMIM#174800) is a genetic disorder caused by gain-of-function mutations of *Gsa* that affects bone and other organs. The bone disease is the most severe and least treatable aspect of FD/MAS. Affected bones deform, fracture and ache causing crippling and wheelchair confinement. Neurological symptoms and, rarely, death may also occur (1). In FD, normal bone and marrow are replaced by a fibrotic tissue including newly formed bone that is soft and fragile due to deficient mineralization (osteomalacia) and increased resorption (osteolysis). Using an FD mouse model that we generated in our previous Telethon projects, EF1a-GsaR201C mice (2), we first demonstrated that osteomalacia and osteolysis in the FD bone are caused, respectively, by ectopic production of Matrix-Gla-Protein (MGP) and excess secretion of Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand (RANKL). Then we showed that targeting RANKL in FD mice, by an anti-mouse RANKL antibody, reverted established skeletal lesions and prevented the development of new ones (3). These effects have never been observed with Bisphosphonates (BPs), anti-resorptive drugs currently used to treat FD that provide some clinical benefits but do not affect the pathology and the natural history of the disease. Pending further studies on the relapse of skeletal lesions after treatment discontinuation, our results show that RANKL inhibition may be a potential effective therapy for FD patients. To this regard, it must be noted that a humanized anti-RANKL antibody (denosumab) is already available and used for some skeletal diseases. Our results also show, for the first time, that osteoclasts and/or osteoclast precursors negatively modulate osteogenic activity within the FD tissue, thus indicating a new line of research that may lead to the identification of further therapeutic targets. Finally, we investigated the specific cellular sources of MGP and RANKL in the FD microenvironment by developing new GsaR201C transgenic mouse lines with tissue-targeted expression of the transgene. Since we previously demonstrated that transgenic mice expressing GsaR201C in osteoblasts do not reproduce FD (4), we targeted the expression of the mutation to osteoprogenitor cells (SM22-Cre;R26-LSL-GsaR201C mice) and to marrow adipocytes at late and early stages of differentiation (AdipoQ-Cre;R26-LSL-GsaR201C and AP2-Cre;R26-LSL-GsaR201C mice, respectively). SM22-Cre;R26-LSL-GsaR201C mice develop a skeletal phenotype essentially characterized by osteolysis, consistent with our hypothesis that perivascular osteoprogenitor cells contribute to RANKL production in FD. AdipoQ-Cre;R26-LSL-GsaR201C mice develop a complex skeletal phenotype but do not reproduce FD. In contrast, AP2-Cre;R26-LSL-GsaR201C mice develop a full-blown FD phenotype, thus demonstrating for the first time that the cellular origin of FD must be sought for in cell types of the bone/bone marrow that express AP2.

La Displasia Fibrosa/Sindrome di McCune-Albright (FD/SMA, OMIM#174800) è un disordine genetico causato da mutazioni attivanti di *Gsa* che colpisce le ossa e altri organi. La malattia scheletrica è l'aspetto più grave e meno trattabile della DF/SMA. Le ossa si deformano, si fratturano e dolgono

causando grave invalidità. Sono possibili anche sintomi neurologici e raramente la morte (1). Nella DF osso e midollo sono sostituiti da un tessuto fibroso comprendente osso neoformato soffice e fragile in quanto caratterizzato da ridotta mineralizzazione (osteomalacia) e aumentato riassorbimento (osteolisi). Utilizzando un modello murino DF generato nei nostri precedenti progetti Telethon, topi EF1a-GsaR201C (2), abbiamo prima dimostrato che l'osteomalacia e l'osteolisi nell'osso DF sono causate, rispettivamente, da produzione inappropriata di Matrix-Gla-Protein (MGP) e da eccessiva secrezione di Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand (RANKL). Quindi abbiamo dimostrato che la somministrazione di un anticorpo anti-RANKL murino ai topi DF, determinava la reversione delle lesioni scheletriche preesistenti e preveniva lo sviluppo di nuove lesioni (3). Questi effetti non sono mai stati osservati con i Bifosfonati (BP), farmaci anti-riassorbimento usati per trattare la DF che riducono il dolore ma non modificano la patologia e la storia naturale della malattia. In attesa di ulteriori studi sulla recidiva delle lesioni al termine del trattamento, i nostri risultati dimostrano che l'inibizione di RANKL può rappresentare una terapia potenzialmente efficace per la DF. A questo proposito, va notato che un anticorpo anti-RANKL umanizzato (denosumab) è già disponibile e utilizzato per alcune malattie scheletriche. I nostri risultati dimostrano anche, per la prima volta, che gli osteoclasti e/o i loro precursori modulano negativamente l'osteogenesi nelle lesioni DF, indicando così una nuova linea di ricerca che può portare all'identificazione di ulteriori target terapeutici. Infine, abbiamo studiato l'origine cellulare di MGP e RANKL nella DF sviluppando nuovi topi transgenici. Poiché in precedenza abbiamo dimostrato che topi che esprimono GsaR201C negli osteoblasti non riproducono la DF (4), abbiamo indotto l'espressione della mutazione nelle cellule osteoprogenitrici (topi SM22-Cre;R26-LSL-GsaR201C) e negli adipociti midollari in stadi tardivi o precoci del differenziamento (topi AdipoQ-Cre;R26-LSL-GsaR201C e AP2-Cre;R26-LSL-GsaR201C, rispettivamente). I topi SM22-Cre;R26-LSL-GsaR201C sviluppano osteolisi, coerentemente con la nostra ipotesi che le cellule osteoprogenitrici perivascolari contribuiscono alla produzione di RANKL nella DF. I topi AdipoQ-Cre;R26-LSL-GsaR201C sviluppano un fenotipo scheletrico diverso dalla DF. Al contrario, i topi AP2-Cre; R26-LSL-GsaR201C riproducono la DF, dimostrando così per la prima volta che l'origine cellulare della DF deve essere ricercata in cellule dell'osso/midollo osseo che esprimono AP2.

1. Corsi A, Cherman N, Donaldson DL, Robey PG, Collins MT, Riminucci M. Neonatal McCune-Albright Syndrome: a unique syndromic profile with an unfavorable outcome. *JBM Plus*. 2019 Jan 15;3(8):e10134. doi: 10.1002/jbm4.10134.
2. Saggio I, Remoli C, Spica E, Cersosimo S, Sacchetti B, Robey P, Holmbeck K, Boyde A, Bianco P, Riminucci M. Constitutive expression of GsaR201C in mice produces a heritable, direct replica of human fibrous dysplasia bone pathology and demonstrates its natural history. *J Bone Miner Res* 2014, 29:2357-68.
3. Palmisano B, Spica E, Remoli C, Labella R, Di Filippo A, Donsante S, Bini F, Raimondo D, Marinozzi F, Boyde A, Robey P, Corsi A, Riminucci M. RANKL Inhibition in Fibrous Dysplasia of Bone: A Preclinical Study in a Mouse Model of the Human Disease. *J Bone Miner Res*. 2019 Jul 11. doi: 10.1002/jbmr.3828. [Epub ahead of print]
4. Remoli C, Michienzi S, Sacchetti B, Di Consiglio A, Cersosimo S, Spica E, Robey PG, Holmbeck K, Cumano A, Boyde A, Davis G, Saggio I, Riminucci M, Bianco P. Osteoblast-specific expression of the Fibrous Dysplasia (FD) causing mutation, GsaR201C produces a high bone mass phenotype but does not reproduce FD in the mouse. *J Bone Miner Res* 2015, 30:1030-43

Coordinator: Mara Riminucci

**Telethon Project (nr):**

GGP15198

**Disease Name:**

Fibrous Dysplasia

**Keywords:**

animal models, preclinical studies, genotype/phenotype correlation

## Poster P.13.104

### TMEM16E / ANO5 MUTATIONS RELATED TO BONE DYSPLASIA OR MUSCULAR DYSTROPHY CAUSE OPPOSITE EFFECTS ON LIPID SCRAMBLING

Di Zanni E., Gradogna A., Picco C., Scholz--Starke J., Boccaccio A.\*

*IBF - CNR ~ Genova ~ Italy*

Gnathodiaphyseal dysplasia (GDD) is a rare autosomal-dominant generalized skeletal syndrome characterized by bone fragility, sclerosis of tubular bones and fibro-osseous lesions of the jawbones.

It is associated with mutations in the GDD1 gene, also known as TMEM16E or Ano5, belonging to the TMEM16 or Anoctamin family of integral membrane proteins. Interestingly, the same gene is involved in different forms of muscular dystrophy (LGMD2L, limb-girdle muscular dystrophy-2I and distal MMD3, miyoshi muscular dystrophy-3), although there is no overlap with mutations associated to GDD and neither with the clinical phenotype.

Members of the TMEM16 protein family are involved in a variety of functions that include ion transport, phospholipid scrambling and regulation of other membrane proteins.

Exploiting its partial plasma membrane localization following transient overexpression in HEK293 cells, we demonstrated that human TMEM16E has a Ca<sup>2+</sup>-activated phospholipid scramblase activity, associated to the development of a non selective ion current (Di Zanni et al 2018).

Additionally we investigated in the same expression system the effect of GDD-related amino acid exchanges on TMEM16E function that lead to a gain-of-function phenotype, showing scramblase activity at basal cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels (Di Zanni et al 2018). These experiments also revealed that the gradual changes in HEK293 cell morphology observed upon expression of GDD-related TMEM16E mutants are a consequence of aberrant protein activity.

Contrarily muscular dystrophy causing mutations, involving residues localized in the putative scrambling domain of the protein, cause a loss of function phenotype.

These results firmly establish functional activity of TMEM16E as a Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid scramblase and the effect of disease causing mutations. This information is a prerequisite to advance hypotheses on TMEM16E physiological role and the pathological mechanism leading to disease.

La displasia gnatiadisaria (GDD) è una rara sindrome scheletrica ereditaria caratterizzata da fragilità ossea, sclerosi delle ossa tubolari e lesioni fibro-ossee delle ossa mascellari. La malattia è ereditata con modalità autosomica dominante ed è associata a mutazioni nel gene GDD1, noto anche come TMEM16E o Ano5, che codifica per una proteina appartenente alla famiglia di proteine integrali di membrana TMEM16 o Anoctamina. Lo stesso gene è coinvolto in diverse forme di distrofia muscolare (LGMD2L, "limb-girdle muscular dystrophy-2I" e distal-MMD3, "miyoshi muscular dystrophy-3"), anche se non vi è alcuna sovrapposizione con le mutazioni associate alla sindrome scheletrica GDD e con la sua manifestazione clinica.

I membri della famiglia di proteine TMEM16 hanno varie funzioni, trasporto ionico, traslocazione (scrambling) di fosfolipidi e regolazione di altre proteine di membrana.

Nel presente studio, inizialmente supportato da Telethon con un finanziamento Exploratory, abbiamo studiato la funzione della proteina TMEM16E e l'effetto delle mutazioni di singoli amino acidi associate alle malattie.

Abbiamo dimostrato che la proteina funziona come trasportatore di lipidi (scramblase) attivato dalla

presenza di calcio citoplasmatico e che le mutazioni associate alla malattia scheletrica e alla distrofia muscolare hanno effetti opposti sulla funzionalità della proteina.

Questa informazione è un prerequisito per avanzare ipotesi sul suo ruolo fisiologico e il meccanismo patologico che porta alla malattia scheletrica GDD e alla distrofia muscolare associata.

Di Zanni E, Gradogna A, Scholz-Starke J, Boccaccio A. Gain of function of TMEM16E/ANO5 scrambling activity caused by a mutation associated with gnathodiaphyseal dysplasia. Cell Mol Life Sci. 2018 May;75(9):1657-1670. doi: 10.1007/s00018-017-2704-9.

Displasia gnatodiafisaria

Coordinator: Anna Elisabetta Boccaccio

Duration (N. Years): 1

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GEP15078

**Disease Name:**

Gnathodiaphyseal Dysplasia

**Keywords:**

gnathodiaphyseal dysplasia, muscular dystrophy, phospholipid scrambling



## Poster P.13.105

### OSTEOPETROSIS AND BARTTER SYNDROME: STRUCTURAL-FUNCTIONAL INVESTIGATION OF MUTATIONS CAUSING DISEASES

Di Zanni E.\*, Lagostena L., Picollo A.

*Istituto di Biofisica ~ Genova ~ Italy*

The gene family of chloride transporting proteins, CLC, includes plasma membrane chloride channels and endosomal/lysosomal Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. CLC proteins are involved in many physiological processes including renal Cl<sup>-</sup> transport, skeletal muscle excitability, cell volume regulation and acidification of intracellular compartments. Independently of the ion transport mechanism (at least) four of the human CLCs (CLC-Ka and Kb, CLC-7, CLC-2) form heteromultimeric complexes with auxiliary  $\beta$ -subunits (Barttin, OSTM1, GliaCAM). Association of CLCs with their specific auxiliary  $\beta$ -subunits ensures proper targeting and stability at the complex.

Defects in genes encoding CLC proteins or their auxiliary subunits are associated with hereditary diseases. Loss of function mutations in the renal CLC-Ks and their subunit Barttin are associated with type III and IV Bartter syndrome, while mutations in the lysosomal CLC-7/Ostm1 complex lead to osteopetrosis and lysosomal storage diseases.

We used a combination of electrophysiological, confocal and optical assay to study the functional properties of mutations causing osteopetrosis and Bartter syndrome type IV.

We investigated 14 missense mutations in CLC-7 protein causing different type of osteopetrosis: autosomal recessive, autosomal recessive with primary neurodegeneration, and autosomal dominant. We found that autosomal recessive mutations are not functional, and localize inside in the protein, while the autosomal dominant mutations maintain Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchange, but with alternated kinetics of activation and/or de-activation and are at the interface between the transmembrane region and the cytosolic part.

We also investigated the functional properties of two new identified mutations in Barttin protein causing Bartter syndrome type IV. Preliminary results suggest two different behaviors: one mutant show a trafficking defect, while the other shows partially reduced functionality.

Data emerging from these two projects will help to understand the pathophysiology of two different genetic diseases: Osteopetrosis and Bartter syndrome type III. Moreover the functional-structural information could be useful for future drug discovery and development of therapeutic treatments.

Analisi struttura-funzione di singole mutazioni che causano Osteopetrosi e sindrome di Bartter

Lagostena, et al, JASN 2019

Osteopetrosi e Sindrome di Bartter

Coordinator: Alessandra Picollo

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

TCP14008

**Disease Name:**

Osteopetrosis and Bartter's Syndrome

**Keywords:**

CLC chloride channels, Bartter syndrome, Osteopetrosis

## 14\_Genetic cardiac disease

## Poster P.14.106

### OXIDIZED LDL/CD36/PPAR $\gamma$ CIRCUITRY IS A TRIGGER OF ADIPOGENESIS IN ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY

**Sommariva E.\*<sup>[1]</sup>**, Stadiotti I.<sup>[1]</sup>, Casella M.<sup>[1]</sup>, Catto V.<sup>[1]</sup>, Dello Russo A.<sup>[1]</sup>, Arnaboldi L.<sup>[3]</sup>, Milano G.<sup>[1]</sup>, Scopece A.<sup>[1]</sup>, Koenig E.<sup>[2]</sup>, Meraviglia V.<sup>[2]</sup>, De Musso M.<sup>[2]</sup>, Volani C.<sup>[2]</sup>, Turnu L.<sup>[1]</sup>, Andreini D.<sup>[1]</sup>, Corsini A.<sup>[3]</sup>, Tondo C.<sup>[1]</sup>, Rossini A.<sup>[2]</sup>, Pompilio G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute for Biomedicine, Eurac Research ~ Bolzano ~ Italy,

<sup>[3]</sup>Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy

**Background.** Arrhythmogenic Cardiomyopathy (ACM) is a genetic condition hallmarked by fibro-fatty replacement of the ventricular myocardium and malignant arrhythmias<sup>1</sup>. Cardiac mesenchymal stromal cells (C-MSC) differentiate into adipocytes in ACM patient hearts, through the activation of PPAR $\gamma$ , caused by ACM mutations (e.g. PKP2)<sup>2</sup>. The clinical phenotype of ACM is highly variable for poorly understood reasons and PPAR $\gamma$  modulation has never been investigated. 13-hydroxy-octadecadienoic acid (13HODE), a component of oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) is a direct activator of PPAR $\gamma$ . In other cell models 13HODE creates a feed-forward loop increasing both PPAR $\gamma$  and the oxLDL receptor CD36, resulting in fat accumulation<sup>3</sup>.

**Purpose.** To investigate the effects of oxLDL and PPAR $\gamma$  agonists on ACM adipogenesis and to dissect the involved pathways.

**Results.** We observed higher plasma oxLDL in ACM patients compared to HC. oxLDL levels also discriminate between ACM patients with overt phenotype and their unaffected relative carriers of the same causative mutations. We observed higher oxidative stress and CD36 concentration in ACM ventricular tissue, compared to HC.

In basal conditions, ACM C-MSC showed greater oxidative stress, higher expression of PPAR $\gamma$  and a trend of higher expression of CD36 compared to HC C-MSC. The adipogenic stimulation led to a parallel increase of CD36 and lipid accumulation, mainly in ACM C-MSC. OxLDL and 13HODE administration increased lipid accumulation in ACM C-MSC. On the contrary, the antioxidant N-Acetylcysteine (NAC) prevented lipid accumulation in ACM C-MSC. Through CD36 silencing of ACM C-MSC, we obtained a significantly lower lipid accumulation if compared to non-silenced cells.

Spontaneous lipid accumulation in ACM iPSC-CM cultured in basal medium was limited. In agreement to what observed in C-MSC, CD36 membrane expression showed a trend of higher concentration in ACM iPSC-CM than in controls. When exposed to adipogenic medium containing a PPAR $\gamma$  agonist (rosiglitazone), ACM iPSC-CM exhibited a higher content of intracellular lipid accumulation compared to HC iPSC-CM. The treatment with adipogenic medium led to an increase of CD36 expression both in HC and ACM iPSC-CM.

Heterozygous Pkp2 knock-out mice (Pkp2<sup>+/-</sup>) mice do not spontaneously accumulate adipocytes in the heart<sup>4</sup>, however murine Pkp2<sup>+/-</sup> C-MSC are more prone to lipid accumulation in vitro than WT cells. Accordingly, mice have low plasma oxLDL and cardiac oxidative stress. By increasing plasma cholesterol and oxidative stress through the administration of a high fat diet, we observed fibro-fatty substitution in the heart of Pkp2<sup>+/-</sup> mice.

**Conclusions.** These findings reveal a modulatory role of oxidative stress and oxidized lipids in ACM cardiac adipogenesis at a cellular, tissue and clinical level, enlightening novel targets for pharmacological strategies to prevent adipogenic substitution and consequent ACM clinical phenotypes.

Contributo dello stress ossidativo e dei lipidi ossidati nella patogenesi della Cardiomiopatia Aritmogena.

La cardiomiopatia aritmogena (ACM) è una malattia genetica che può portare a morte improvvisa caratterizzata da aritmie e da accumulo di grasso nel cuore. Ad oggi, non esistono terapie capaci di prevenirla/rallentarne la progressione.

A causa del difetto genetico dei pazienti ACM, le loro cellule mesenchimali stromali cardiache (C-MSC) differenziano in cellule adipose, attraverso l'aumento di PPAR $\gamma$ , il principale mediatore del processo adipogenico. La mutazione genetica però spesso non è sufficiente per la manifestazione clinica dell'ACM, suggerendo il coinvolgimento di altri fattori. Il ruolo di modulatori di PPAR $\gamma$  non è mai stato investigato. L'acido 13-idrossi-octadecadienoico (13HODE) è un attivatore di PPAR $\gamma$  ed è un componente delle LDL ossidate (oxLDL). In altre patologie, il 13HODE crea un circolo vizioso che porta all'aumento dei livelli di PPAR $\gamma$  e di CD36, recettore delle oxLDL, causando ulteriore entrata di 13HODE nelle cellule e stimolandole all'adipogenesi.

L'obiettivo di questo progetto è di investigare il ruolo delle oxLDL e di attivatori di PPAR $\gamma$  nel processo adipogenico ACM e di capirne i meccanismi.

I nostri risultati dimostrano più elevati livelli plasmatici di oxLDL nei pazienti ACM, sia se paragonati a controlli sani sia ai loro famigliari mutati ma senza sintomi della patologia. Inoltre, nel tessuto cardiaco, lo stress ossidativo e l'espressione di CD36 sono più alti.

Anche le C-MSC ACM hanno elevato stress ossidativo, alta espressione di PPAR $\gamma$  e un trend di maggiore espressione di CD36, se comparate a cellule di controllo. Stimolando le C-MSC a differenziare in senso adipogenico, abbiamo ottenuto un parallelo aumento di CD36 e accumulo lipidico, soprattutto nelle cellule ACM. Il trattamento di C-MSC ACM con oxLDL o 13HODE provoca un aumento di accumulo lipidico che è invece prevenuto dal trattamento con un antiossidante. Inoltre, silenziando l'espressione di CD36 nelle cellule ACM, si osserva minore accumulo lipidico, rispetto a cellule non silenziate.

Come per le C-MSC, anche cardiomiociti ACM derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-CM), mostrano trend di maggiore espressione di CD36. Stimolandole con un agonista di PPAR $\gamma$ , iPSC-CM ACM sono più predisposti all'accumulo e ad un aumento di CD36 rispetto ai controlli.

Il modello murino di ACM non accumula spontaneamente adipociti nel cuore, ma le C-MSC isolate da questi topi sono più predisposte all'accumulo lipidico in vitro rispetto ai controlli. In accordo con la nostra ipotesi, i topi hanno bassi oxLDL plasmatiche e stress ossidativo cardiaco. Inducendo un aumento di colesterolo e stress ossidativo, abbiamo osservato sostituzione adiposa nel cuore dei topi ACM.

In conclusione, i dati ottenuti dimostrano il contributo di stress ossidativo e lipidi ossidati nell'adipogenesi cardiaca ACM, aprendo prospettive per nuove terapie per i pazienti.

1. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 2009;373:1289-1300
2. Sommariva E, Brambilla S, Carbucicchio C, Gambini E, Meraviglia V, Dello Russo A, Farina FM, Casella M, Catto V, Pontone G, Chiesa M, Stadiotti I, Cogliati E, Paolin A, Ouali Alami N, Preziuso C, d'Amati G, Colombo GI, Rossini A, Capogrossi MC, Tondo C, Pompilio G. Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2016;37:1835-1846
3. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized ldl regulates macrophage gene expression through ligand activation of ppargamma. *Cell*. 1998;93:229-240
4. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang FX, van der Nagel R, Hund T, Birchmeier W,

Mohler P, van Veen TA, van Rijen HV, Delmar M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. Cardiovasc Res. 2012;95:460-468

Cardiomiopatia Aritmogena

Coordinator: Giulio Pompilio

Partners: Alessandra Rossini, Alberto Corsini

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16001

**Disease Name:**

Arrhythmogenic Cardiomyopathy

**Keywords:**

oxLDL, PPAR?, pathogenesis cofactor

## **15\_Genetic developmental defect during embryogenesis**

## Poster P.15.107

### MUTATIONS OF THE SUBCORTICAL MATERNAL COMPLEX AND IMPRINTING DISORDERS: HOW THE GENOTYPE INTERACTS WITH THE EPIGENOTYPE

Riccio A.\*

*CNR, Istituto di genetica e Biofisica A. Buzzati-Traverso ~ Napoli ~ Italy*

The parent-of-origin-specific expression of the imprinted genes is directed by differential DNA methylation of Imprinting Control Regions (ICRs). Maternal-effect variants of members of the subcortical maternal complex (SCMC) are associated with Multi Locus Imprinting Disturbances (MLID) in the Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) and Silver-Russell syndrome (SRS), and with complete loss of maternal imprints in Biparental Hydatiform Mole (BiHM), indicating a role in both oocyte imprinting establishment and post-zygotic imprinting maintenance. However, the mechanism linking these cytoplasmic proteins to methylation control is unknown. Here we describe several cases with maternal-effect variants of different SCMC genes, in which the analysis of DNA methylation provides new information on the role of these proteins. First, in a case of recurrent BiHM carrying a loss of function variant of KHDC3L in homozygosity, genome-wide DNA methylation analysis demonstrated specific loss of ICR methylation in the molar conceptus, but extensive hypomethylation in oocytes, indicating a role of KHDC3L in de novo DNA methylation in the maternal germline. Second, a woman, who is compound heterozygous for loss-of-function variants of NLRP5, had a child with BWS, multiple miscarriages and a further healthy child. Mosaic MLID including KCNQ1OT1 hypomethylation was demonstrated in both affected and unaffected siblings, suggesting a sort of compensation occurring between demethylated imprinted loci in the healthy child. Third, we demonstrated loss-of function maternal variants of PADI6 in three cases of BWS with MLID, including a family with two affected siblings. These results indicate that maternal loss-of-function variants of SCMC genes may impair DNA methylation with different mechanisms and be associated with extremely different phenotypes in the offspring but high familial recurrence risk. The analysis of larger cohorts of patients is needed to formulate more accurate genotype-epigenotype-phenotype correlations in the case of maternal SCMC variants.

Ruolo delle mutazioni materne nei disordini dell'imprinting: come il genotipo della madre influenza l'epigenotipo dei figli

La sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS) e la Sindrome di Silver-Russell (SRS) sono causate da difetti di geni definiti "imprinted", che hanno la caratteristica di funzionare su una soltanto delle due copie che sono normalmente ereditate dai genitori. Questa particolarità è dovuta alla presenza di segnali di metilazione del DNA diversi sul cromosoma di origine materna e su quello di origine paterna. La BWS e la SRS insorgono quando questi segnali di metilazione sono alterati e questo avviene in genere nei gameti o nell'embrione di pochi giorni di vita. Alcuni pazienti hanno difetti di metilazione su un solo gene, altri li hanno in molti geni presenti su cromosomi diversi. E' stato recentemente dimostrato che questi difetti di metilazioni multipli sono causati da mutazioni materne delle proteine del complesso sub-corticale (SCMC). In questo studio dimostriamo come mutazioni materne delle proteine SCMC possono alterare la metilazione de novo negli oociti o il mantenimento della metilazione nell'embrione precoce e causare fenotipi estremamente diversi nella progenie, che



vanno dalla Mola Idatiforme Ricorrente ai disordini dell'imprinting o in alcuni casi essere compatibili con uno stato apparentemente normale.

1. Monk D, Mackay DJG, Eggermann T, Maher ER and Riccio A\*. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nat Rev Genet.* 2019 Apr;20(4):235-248. doi: 10.1038/s41576-018-0092-0.
2. Federica Maria Valente, Angela Sparago, Andrea Freschi, Katherine Hill-Harfe, Saskia M. Maas, Suzanna Frints, Marielle Alders, Laura Pignata, Monica Franzese, Claudia Angelini, Diana Carli, Alessandro Mussa, Andrea Gazzin, Fulvio Gabbarini, Basilia Acurzio, Giovanni Battista Ferrero, Jet Blik, Charles A. Williams, Andrea Riccio\*, Flavia Cerrato\* Transcription alterations of KCNQ1 associated with imprinted methylation defects in the Beckwith-Wiedemann locus. *Genet Med.* 2019 Jan 12. doi: 10.1038/s41436-018-0416-7.
3. Sparago A, Cerrato F, Riccio A\* (2018) Is ZFP57 binding to H19/IGF2:IG-DMR affected in Silver-Russell syndrome? *Clinical Epigenetics* 2018, 10:23. Doi: 0.1186/s13148-018-0454-7
4. Freschi A, Hur SK, Valente FM, Ideraabdullah FY, Sparago A, Gentile MT, Oneglia A, Di Nucci D, Colucci-D'Amato L, Thorvaldsen JL, Bartolomei MS\*, Riccio A\*, Cerrato F. (2018) Tissue-specific and mosaic imprinting defects underlie opposite congenital growth disorders in mice *PLoS Genet.* 2018 Feb 22;14(2):e1007243. doi: 10.1371/journal.pgen.1007243.
5. Brioude F, Kalish JM, Mussa A, Foster AC, Blik J, Ferrero GB, Boonen SE, Cole T, Baker R, Bertolotti M, Cocchi G, Coze C, De Pellegrin M, Hussain K, Ibrahim A, Kilby MD, Krajewska-Walasek M, Kratz CP, Ladusans EJ, Lapunzina P, Le Bouc Y, Maas SM, Macdonald F, Öunap K, Peruzzi L, Rossignol S, Russo S, Shipster C, Skórka A, Tatton-Brown K, Tenorio J, Tortora C, Grønskov K, Netchine I, Hennekam RC, Prawitt D, Tümer Z, Eggermann T, Mackay DJG, Riccio A, Maher ER. (2018) Clinical and Molecular Diagnosis, Screening and Management of Beckwith-Wiedemann syndrome: An International Consensus Statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Apr;14(4):229-249. doi: 10.1038/nrendo.2017.166.
6. Mussa A, Molinatto C, Cerrato F, Palumbo O, Carella M, Carli D, Baldassarre G, Peris C, Riccio A and Ferrero GB (2017) Assisted Reproductive Technologies and Risk of Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Pediatrics.* 2017 Jul;140(1). pii: e20164311. doi: 10.1542/peds.2016-4311.
7. Hur SK, Freschi A, Ideraabdullah F, Thorvaldsen JL, Luense L, Hines A, Berger SL, Cerrato F\*, Riccio A\*, Bartolomei MS\*. (2016) Humanized H19/Igf2 locus reveals diverged imprinting mechanism between mouse and human and reflects Silver-Russell Syndrome phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Sep 27;113(39):10938-43. doi:10.1073/pnas.1603066113 \*Co-corresponding authors.
8. Riso V, Cammisa M, Kukreja H, Anvar Z, Verde G, Sparago A, Acurzio B, Lad S, Lonardo E, Sankar A, Helin K, Feil R, Fico A, Angelini C, Grimaldi G, Riccio A. ZFP57 maintains the parent-of-origin-specific expression of the imprinted genes and differentially affects non-imprinted targets in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2016 Sep 30;44(17):8165-78.
9. Mussa A, Molinatto C, Baldassarre G, Riberi E, Russo S, Larizza L, Riccio A, Ferrero GB. (2016) Cancer Risk in Beckwith-Wiedemann Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis Outlining a Novel (Epi)Genotype Specific Histotype Targeted Screening Protocol. *J Pediatr.* 2016 Jun 29. pii: S0022-3476(16)30246-3. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.05.038.
10. Boonen SE, Freschi A, Christensen R, Valente FM, Lildballe DL, Perone L, Palumbo O, Carella M, Ulbjerg N, Sparago A, Riccio A\*, Cerrato F\*. Two maternal duplications involving the CDKN1C gene are associated with contrasting growth phenotypes. *Clin Epigenetics.* 2016 Jun 16;8:69. doi: 10.1186/s13148-016-0236-z. \*Co-corresponding authors.
11. Sanchez-Delgado M, Riccio A, Eggermann T, Maher ER, Lapunzina P, Mackay D, Monk D.

Causes and Consequences of Multi-Locus Imprinting Disturbances in Humans. *Trends Genet.* 2016 Jul;32(7):444-55. doi: 10.1016/j.tig.2016.05.001.

12. Eggermann K, Bliiek J, Brioude F, Algar E, Buiting K, Russo S, Tümer Z, Monk D, Moore G, Antoniadi T, Macdonald F, Netchine I, Lombardi P, Soellner L, Begemann M, Prawitt D, Maher ER, Mannens M, Riccio A, Weksberg R, Lapunzina P, Grønsvov K, Mackay DJ, Eggermann T. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of chromosome 11p15 imprinting disorders: Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2016 Oct;24(10):1377-87. doi: 10.1038/ejhg.2016.45. IF 2015: 4.580. Citazioni WoS: 0. Scopus: 2

13. Anvar Z, Cammisa M, Riso V, Baglivo I, Kukreja H, Sparago A, Girardot M, Lad S, De Feis I, Cerrato F, Angelini C, Feil R, Pedone PV, Grimaldi G, Riccio A. (2016) ZFP57 recognizes multiple and closely spaced sequence motif variants to maintain repressive epigenetic marks in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 18;44(3):1118-32. doi: 10.1093/nar/gkv1059.

14. Mussa A, Russo S, De Crescenzo A, Freschi A, Calzari L, Maitz S, Macchiaiolo M, Molinatto C, Baldassarre G, Mariani M, Tarani L, Bedeschi MF, Milani D, Melis D, Bartuli A, Cubellis MV, Selicorni A, Cirillo Silengo M, Larizza L, Riccio A\*, Ferrero GB\*. (2016) (Epi)genotype–phenotype correlations in Beckwith–Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2016 Feb;24(2):183-90. doi: 10.1038/ejhg.2015.88. \*Co-corresponding authors.

15. Mussa A, Di Candia S, Russo S, Catania S, De Pellegrin M, Di Luzio L, Ferrari M, Tortora C, Meazzini MC, Brusati R, Milani D, Zampino G, Montiroso R, Riccio A, Selicorni A, Cocchi G, Ferrero GB. (2016) Recommendations of the Scientific Committee of the Italian Beckwith-Wiedemann Syndrome Association on the diagnosis, management, and follow-up of the syndrome. *Eur J Med Genet.* 2016 Jan;59(1):52-64. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.11.008.

16. Eggermann T, Perez de Nanclares G, Maher ER, Temple IK, Tümer Z, Monk D, Mackay DJG, Grønsvov K, Riccio A, Linglart A and Netchine I (2015) Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics.* 2015 Nov 14;7:123. doi: 10.1186/s13148-015-0143-8.

Sindrome di Beckwith-Wiedemann, Sindrome di Siver-Russell

Coordinator: Andrea Riccio

Durationg (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GGP15131

**Disease Name:**

Beckwith-Wiedemann Syndrome/Siver-Russell Syndrome

**Keywords:**

Epigenetics, Growth disorders, Genomic imprinting

## Poster P.15.108

### A NOVEL SEMA3G MUTATION IN TWO SIBLINGS AFFECTED BY HYPOGONADISM, DEVELOPMENTAL DELAY AND FACIAL MALFORMATIONS

Oleari R.<sup>[1]</sup>, Lettieri A.<sup>[1]</sup>, Eberini I.<sup>[1]</sup>, Bedogni F.<sup>[2]</sup>, Gaston--Massuets C.<sup>[3]</sup>, Cariboni A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Univerisity of Mllan, DISFEB ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Queen Mary University ~ London ~ United Kingdom

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency causes hypogonadotropic hypogonadism (HH), a rare genetic disorder that impairs sexual reproduction. HH can be due to defective development or function of GnRH-secreting neurons, with most of the cases being idiopathic. Further, HH may be present in association with other phenotypic features in overlapping genetic syndromes. Here, by applying homozygosity mapping together with exome sequencing we have identified shared mutations in the Semaphorin 3G (SEMA3G), Natural killer cell triggering Receptor (NKTR) and Rhotekin (RTKN) genes in two brothers affected by a novel genetic syndrome characterised by HH, facial dysmorphic features and developmental delay. In silico, in vitro and in vivo models revealed that SEMA3G regulates GnRH neuron migration and that its mutation affecting receptor selectivity may be responsible for the HH-related defects, while NKTR and RTKN may be involved in the control of cartilage formation and cortical neuron migration, respectively. Dissecting the genetic basis of this novel multi-trait syndrome therefore revealed fundamental but hitherto unidentified mechanisms in GnRH neuron and craniofacial development.

Il deficit di rilascio dell'ormone GnRH provoca ipogonadismo ipogonadotropico (II), una rara malattia genetica che compromette la riproduzione sessuale. L'HH può essere dovuto ad un difetto nello sviluppo dei neuroni che secernono GnRH, con la maggior parte dei casi idiopatici. Inoltre, l'II può essere presente in associazione con altre caratteristiche cliniche in sindromi genetiche correlate. Applicando un approccio genetico che prevede la mappatura delle regioni presenti in omozigosi al sequenziamento dell'esoma abbiamo identificato mutazioni condivise nei geni Semaphorina 3G (SEMA3G), Natural killer cell trigger Trigger (NKTR) e Rhotekin (RTKN) in due fratelli affetti da una nuova sindrome genetica caratterizzata da II, dismorfismi facciali e ritardo dello sviluppo. Modelli in silico, in vitro e in vivo hanno rivelato che SEMA3G regola la migrazione dei neuroni GnRH e che la sua mutazione che influenza la selettività del recettore può essere responsabile dei difetti correlati all'II, mentre NKTR e RTKN possono essere coinvolti nel controllo della formazione della cartilagine e della migrazione dei neuroni corticali, rispettivamente. Analizzare le basi genetiche di questa nuova sindrome multi-tratto ha quindi rivelato meccanismi fondamentali ma finora non identificati nel neurone GnRH e nello sviluppo craniofacciale.

Boehm, U., Bouloux, P.-M., Dattani, M. T., de Roux, N., Dodé, C., Dunkel, L., Dwyer, A. A., Giacobini, P., Hardelin, J.-P., Juul, A., et al. (2015). Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 547–64.

Ipogonadismo ipogonadotropo

Coordinator: Cariboni Anna

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2013

Project ending year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GGP13142

**Disease Name:**

Hypogonadotropic Hypogonadism

**Keywords:**

neuroni GnRH, sviluppo craniofacciale, corteccia

## 16\_Genetic eye disease

## Poster P.16.109

### INHIBITION OF AUTOPHAGY CURTAILS VISUAL LOSS IN A MODEL OF AUTOSOMAL DOMINANT OPTIC ATROPHY

Scorrano L.\*

*University of Padua, Dept. of Biology and VIMM ~ Padova ~ Italy*

In Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA) caused by mutations in the mitochondrial cristae biogenesis and fusion protein Optic Atrophy 1 (Opa1), retinal ganglion cell (RGC) dysfunction and visual loss occur by unknown mechanisms. Here we show an unexpected role for autophagosome accumulation at RGC axonal hillocks in ADOA pathogenesis. Expression of mutated Opa1 in RGCs causes heterogeneous mitochondrial dysfunction and triggers AMPK- and tubulin acetylation dependent autophagosome accumulation at axonal hillocks, reducing axonal mitochondrial content. Pharmacological or genetic inhibition of this pathway restores axonal mitochondrial content and curtails apoptosis caused by mutated Opa1. In *C. elegans*, deletion of AMPK or of key autophagy genes rescues axonal mitochondrial content reduced in neurons where mitochondrial dysfunction was induced. In conditional, RGC specific Opa1-deficient mice, depletion of the essential autophagy gene *Atg7* normalizes the excess autophagy and corrects the visual defects caused by Opa1 ablation. Thus, axonal hillock accumulation of autophagosomes is a conserved mechanism crucial for ADOA pathogenesis.

#### L'INIBIZIONE DELL'AUTOFAGIA BLOCCA LA PERDITA DI VISTA IN UN MODELLO DI ATROFIA OTTICA DOMINANTE

L'atrofia ottica dominante (ADOA) è una malattia genetica caratterizzata da una progressiva perdita della vista, a partire dalla prima infanzia. Questa è causata dalla morte delle cellule gangliari della retina, i neuroni che trasmettono le immagini dall'occhio al cervello. Questa morte è indolore e si verifica ad un ritmo costante nel corso degli anni, e in ultima analisi porta alla cecità. Se vogliamo generare nuovi farmaci che bloccano questa degenerazione, abbiamo bisogno di capire i processi che portano alla perdita di queste cellule. I mitocondri, la "centrale elettrica" delle cellule, non sono solo responsabili per la generazione di energia che le nostre cellule hanno bisogno per vivere, ma sono anche principali attori nelle complesse reti di segnali cellulari. Alcune proteine, chiamate dinamine, controllano la forma dei mitocondri e quando sono danneggiate causano gravi malattie. In particolare, una di queste proteine, chiamata Opa1, è mutata nell'atrofia ottica dominante. Abbiamo scoperto i segnali rilasciati dai mitocondri con Opa1 mutata, e stiamo esplorando se farmaci che interferiscono con questi segnali possono fermare la cecità ingravescente in un modello murino di ADOA. In caso di successo, il nostro progetto porterà alla fase preclinica una potenziale terapia per una malattia attualmente incurabile.

n/a

Atrofia Ottica Dominante

Coordinator: Luca Scorrano

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19089

**Disease Name:**

Autosomal Dominant Optic Atrophy

**Keywords:**

mitochondria, Opa1, autophagy

## Poster P.16.110

### **CONE DYSTROPHIES AND RETINAL DEGENERATION FROM PROTEIN STRUCTURES TO BIOLOGICAL NETWORKS: TOWARD THE DESIGN OF THERAPEUTIC MOLECULES.**

Asteriti S.<sup>[1]</sup>, Boni F.<sup>[2]</sup>, Dal Cortivo G.<sup>[1]</sup>, Marino V.<sup>[3]</sup>, Cangiano L.<sup>[3]</sup>, Milani M.<sup>[4]</sup>, Dell'Orco D.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Verona ~ Verona ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Milan ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Pisa ~ Pisa ~ Italy, <sup>[4]</sup>CNR Biophysics ~ Milan ~ Italy

Cone dystrophy (COD) is a severe form of retinal disorder affecting photoreceptors. Common symptoms include decreased central and color vision, photophobia and, in several patients, cone degeneration is followed by that of rods (CORD), resulting in the progressive loss in peripheral vision. Currently, no cure exists for CORD, which affects 1 in 40,000 people<sup>1</sup>. To date, up to 20 missense mutations in GUCA1A, the gene encoding the calcium sensor guanylate-cyclase-activating protein (GCAP1) have been associated with autosomal dominant COD/CORD. The consequences of alterations in GCAP1 have been only partly explored and mechanisms leading to the onset of the disease remain largely unclear. In this project we have thoroughly characterized GCAP1 variants associated with COD/CORD and their interaction with the target GC1 by applying biochemical, biophysical and electrophysiological approaches, which have all been integrated by computer simulations. The main findings can be summarized as follows:

- Human GCAP1 under physiological conditions presents a dynamic monomer-dimer equilibrium affected by salt and Mg/Ca relative concentrations, that renders its crystallization particularly challenging. However, SAXS studies corroborated by protein docking simulations allowed us to build a 3D model of the GCAP1 dimeric assembly;
- A thorough structural and functional characterization was performed of the previously known COD-associated variants affecting the Ca<sup>2+</sup> binding sites, namely p. E155A/G and p.D100G. All variants show reduced affinity for Ca<sup>2+</sup> and a constitutive activation of the GC1 target at physiological concentrations of Ca<sup>2+</sup>..
- A novel variant (p.E111V) associated with a severe form of CORD has been identified in an Italian family during the project; we fully characterized the protein<sup>2</sup>;
- In silico screening for possible small molecules affecting the interaction between GCAP1 and GC1 led to the identification of a compound that seems to be more selective for the pathogenetic p.D100G variant compared to the wild type GCAP1; the role of this ligand in regulating GC1 enzymatic activity is under investigation;
- Nano-sized liposomes with lipid composition mimicking that of photoreceptor outer segment were produced and their biodistribution was investigated in mouse retina both ex-vivo and following intravitreal injections. The liposomes fuse with retinal membranes and reach all layers including photoreceptor outer segments;
- Liposomes encapsulated with E111V-GCAP1 and delivered in vivo and ex vivo perturb the phototransduction cascade in mouse rods in a way consistent with numerical simulations of the same cascade, thus opening the way to powerful tools for protein therapeutics.

We plan to complete the structural and biochemical characterization of CORD-GCAP1-GC1 interaction and test the physiological effects of both small ligands and recombinant wild-type protein encapsulation into liposome for in vivo delivery.



La distrofia dei coni (COD) è una grave forma di malattia della retina che colpisce i fotorecettori. I sintomi più comuni sono la diminuzione della visione centrale e del colore, la fotofobia e, in molti pazienti, la degenerazione dei coni è seguita da quella dei bastoncelli (CORD), con conseguente progressiva perdita della visione periferica. Attualmente non esiste una cura per la CORD, che colpisce 1 persona su 40.000. Ad oggi sono state identificate 20 mutazioni in GUCA1A, il gene che produce la proteina calcio-sensore che attiva la guanilato-ciclastasi (GCAP1) che l'associano a COD/CORD di tipo autosomico dominante. Le conseguenze delle alterazioni di GCAP1 sono state esplorate solo parzialmente e i meccanismi che portano all'insorgenza della malattia rimangono per lo più poco chiari. In questo progetto abbiamo caratterizzato le varianti di GCAP1 associate a COD/CORD e la loro interazione con il target GC1 applicando approcci biochimici, biofisici ed elettrofisiologici, che sono stati tutti integrati da simulazioni al computer. I principali risultati possono essere riassunti come segue:

- La GCAP1 umana in condizioni fisiologiche presenta un equilibrio dinamico monomero-dimero influenzato dalle concentrazioni relative di sale e  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ , che rende la sua cristallizzazione difficoltosa
- È stata eseguita una completa caratterizzazione strutturale e funzionale delle varianti già identificate in precedenza come associate a COD che interessano i siti di legame  $Ca^{2+}$ , ossia p.E155A/G e p.D100G. Tutte le varianti mostrano una ridotta affinità per il  $Ca^{2+}$  ed attivano costitutivamente il target GC1
- Una nuova variante (p.E111V) associata a una grave forma di CORD è stata identificata in una famiglia italiana durante il progetto e caratterizzata;
- Lo screening al computer di piccole molecole ha portato all'identificazione di un composto che sembra essere più selettivo per la variante patogenica p.D100G rispetto alla proteina wild-type GCAP1 per l'interazione con l'enzima GC1;
- Sono stati prodotti liposomi di dimensioni nanometriche con composizione lipidica simile al segmento esterno dei bastoncelli e studiata la biodistribuzione nella retina del topo. I liposomi si fondono con le membrane retiniche e raggiungono tutti gli strati neuronali compresi i segmenti esterni dei fotorecettori;
- I liposomi incapsulati con E111V-GCAP1 e somministrati in vivo ed ex vivo perturbano la cascata di fototrasduzione nei bastoncelli di topo in modo consistente con quanto predetto dalle simulazioni numeriche della stessa cascata, fornendo quindi un potente strumento di indagine per la terapia proteica.

Prevediamo di completare la caratterizzazione strutturale e biochimica iniziata e di testare gli effetti fisiologici dell'incapsulamento in liposoma di piccoli ligandi e di proteine ricombinanti per una futura somministrazione in vivo.

1. Hamel CP. Orphanet J Rare Dis. 2007 Feb 1;2:7
2. Marino V, Dal Cortivo G, Oppici E, Maltese PE, D'Esposito F, Manara E, Ziccardi L, Falsini B, Magli A, Bertelli M, Dell'Orco D. Hum Mol Genet. 2018;27(24):4204-4217

Distrofia dei coni

Coordinator: Daniele Dell'Orco

Partners: Mario Milani, Lorenzo Cangiano

Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16010

**Disease Name:**

Cone Dystrophy

**Keywords:**

Phototransduction, Retinal dystrophy, Protein therapy

## Poster P.16.111

### ENZYMATIC PHENOTYPE AND RESPONSE TO VITAMIN B6 OF ORNITHINE AMINOTRANSFERASE VARIANTS ASSOCIATED WITH GYRATE ATROPHY OF THE CHOROID AND RETINA

Montioli R.<sup>[1]</sup>, Sgaravizzi G.<sup>[4]</sup>, Desbats M.<sup>[2]</sup>, Grottelli S.G.<sup>[4]</sup>, Paiardini A.P.<sup>[3]</sup>, Giardina G.<sup>[3]</sup>, Zanzoni S.<sup>[5]</sup>, Cutruzzolà F.<sup>[3]</sup>, Borri Voltattorni C.<sup>[1]</sup>, Salviati L.S.<sup>[2]</sup>, Cellini B.<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, Section of Biological Chemistry, University of Verona ~ Verona ~ Italy, <sup>[2]</sup>Clinical Genetics Unit, Department of Woman and Child Health ~ Padova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Department of Biochemical Sciences "A. Rossi Fanelli", Sapienza University of Rome ~ Rome ~ Italy, <sup>[4]</sup>Department of Experimental Medicine, University of Perugia ~ Perugia ~ Italy, <sup>[5]</sup>Centro Piattaforme Tecnologiche, University of Verona ~ Verona ~ Italy

Human ornithine aminotransferase (OAT) is a pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent mitochondrial enzyme that catalyzes the  $\alpha$ -transamination of L-ornithine to glutamate semialdehyde with the concomitant conversion of  $\alpha$ -ketoglutarate to L-glutamate (1). Mutations of the OAT gene cause gyrate atrophy of the choroid and retina (GA), a condition characterized by the degeneration of retinal epithelium cells leading to blindness in the fifth decade of life (2). Herein, we investigated the consequences of selected missense mutations present in homozygous patients and involving residues spread over the enzyme structure. By analyzing the biochemical properties of the purified enzymes we distinguished variants with a mere or predominant catalytic defect (R180T, P199Q, G237D, R154L), from those retaining significant catalytic efficiency but showing a structural defect (Q90E, R271K, E318K, C394Y). Among the first group, we performed a detailed structural, spectroscopic and kinetic analysis of the R180T variant. We found that the variant shares a similar overall conformation with wild-type OAT, with slight structural alterations at the active site and at the dimeric interface, consistent with the increased Km for L-ornithine and altered PLP binding mode and affinity. R180T also exhibits a remarkable loss of catalytic activity, probably due to an improper collocation of L-ornithine that undergoes not only an  $\alpha$ -transamination, but also a  $\beta$ -transamination reaction (3). Hence, we expressed variants endowed with significant catalytic activity but showing structural defects in a cellular model of GA consisting of HEK293 cells knocked-out for the OAT gene (4). We observed distinct behaviors. Q90E and R271K showed a strongly reduced specific activity and expression level, probably due to an increased susceptibility to intracellular degradation, while the E318K mutation did not significantly affect activity and expression level in cells, but produced a protein prone to aggregation. Finally, C394Y retained >50% of the wild-type expression level, but showed a reduced activity, due to a substrate-inhibition phenomenon. Upon culturing cells in the presence of pyridoxine (PN), a precursor of PLP employed as pharmacological treatment, only the Q90E variant was slightly responsive, as shown by a statistically significant increase of transaminase activity. Overall, the data allowed us to (i) unravel the variety of enzymatic phenotypes associated with the disease and (ii) suggest the responsiveness to PN of patients bearing the examined mutations.

L'ornitina aminotransferasi umana (OAT) è un enzima mitocondriale dipendente dal piridossal-5'-fosfato (PLP) (un derivato della Vitamina B6) che catalizza una reazione importante per il catabolismo dell'ornitina (1). Mutazioni del gene OAT causano atrofia girata della coroide e della retina (GA), una malattia rara che ha come sintomo principale la degenerazione delle cellule dell'epitelio della retina e che porta a progressiva perdita della vista fino alla cecità intorno ai 50 anni (2). Le terapie disponibili

per pazienti affetti da GA sono limitate al consumo di una dieta che riduca la produzione di ornitina, o alla somministrazione di Vitamina B6. Tuttavia, sono stati poco studiati gli effetti delle mutazioni su OAT e la possibile risposta delle forme mutate alla Vitamina B6. Nel corso del nostro progetto abbiamo studiato le conseguenze di alcune mutazioni missenso presenti in pazienti omozigoti mediante una duplice strategia basata su analisi di mutanti in forma purificata e su un modello cellulare di malattia. Analizzando le proprietà biochimiche degli enzimi mutanti abbiamo distinto quelle con un difetto funzionale (R180T, P199Q, G237D, R154L), da quelle che conservano una significativa capacità di compiere la reazione di transaminazione ma mostrano un difetto strutturale (Q90E, R271K, E318K, C394Y). All'interno del primo gruppo, abbiamo eseguito un'analisi dettagliata della variante R180T e abbiamo scoperto che tale variante non presenta grosse alterazioni conformazionali rispetto all'OAT wild-type, ma possiede un sito di legame dell'ornitina lievemente alterato. Tali alterazioni non permettono di legare l'ornitina in modo corretto, né di far procedere la reazione ad una velocità sufficiente (3).

Le varianti appartenenti al secondo gruppo invece sono state studiate in un modello cellulare di GA (4) e abbiamo osservato comportamenti variegati. Due varianti (Q90E e R271K) sono presenti a livelli fortemente ridotti nella cellula, probabilmente perché sono più suscettibili a degradazione. La mutazione E318K invece rende la proteina soggetta all'aggregazione. Infine, la variante C394Y è presente a livelli elevati ma mostra un'attività ridotta, a causa di un difetto funzionale. Quando abbiamo cresciuto le cellule in presenza di Vitamina B6, abbiamo osservato una limitata risposta solo per la variante Q90E. Nel complesso, i dati ci hanno permesso di (i) conoscere la varietà di fenotipi enzimatici associati alla malattia e (ii) avere indicazioni sulla possibile risposta alla Vitamina B6 dei pazienti portatori delle mutazioni esaminate.

- 1) Montioli R. et al. (2017) Protein J., 36(3):174-185.
- 2) Ginguay A. et al. (2017) Biology, 6(1), 18
- 3) Montioli R. et al. (2019) FEBS J., 286(14):2787-2798.
- 4) Montioli R. et al. (2018) BBA Mol Bas Dis 1864(11):3629-3638

Atrofia girata della coroide e della retina

Coordinator: Barbara Cellini

Partner: Leonardo Salviati

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GPP15114

**Disease Name:**

Gyrate Atrophy of the Choroid and Retina

**Keywords:**

Gyrate atrophy, Vitamin B6, Molecular defects

## Poster P.16.112

### MODULATION OF MICRORNA EXPRESSION: A NEW THERAPEUTIC AVENUE FOR INHERITED RETINAL DISEASE?

Carrella S.<sup>[1]</sup>, Karali M.<sup>[1]</sup>, Guadagnino I.<sup>[1]</sup>, Pizzo M.<sup>[1]</sup>, Ruiz Ceja K.A.<sup>[1]</sup>, Banfi S.<sup>\*[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>~ Italy

Modulation of microRNA expression: a new therapeutic avenue for inherited retinal disease?

Sabrina Carrella (1,2), Marianthi Karali (1,2), Irene Guadagnino (1), Mariateresa Pizzo (1), Karla Ruiz (1), Sandro Banfi (1)(2)(3).

(1) Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli; (2) Dipartimento di Medicina di Precisione, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Naples, Italy.

(3) Correspondence: Via Campi Flegrei, 34 80078 Pozzuoli (NA), Italy. Phone +3908119230628, email banfi@tigem.it

Inherited Retinal Dystrophies (IRDs) constitute one of the most frequent causes of genetic blindness in the western world. The most frequent and severe forms are Retinitis Pigmentosa (RP), Leber Congenital Amaurosis (LCA), macular dystrophies (MD) and cone and cone-rod dystrophies (CD and CRD, respectively). Despite their remarkable genetic heterogeneity, retinal degeneration due to photoreceptor cell death (PD) is the common outcome of most forms of IRDs. Currently, there are no effective therapies for IRDs and the high genetic and clinical heterogeneities of these conditions constitute a limiting factor for the rapid development of effective gene-based therapeutic strategies. MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs that control fundamental biological processes by targeting networks of functionally correlated genes. Due to their reportedly pervasive control of many pathophysiological processes and to their easy manipulation, miRNAs may represent ideal gene-independent therapeutic tools for IRDs.

Our main goal is to identify miRNAs putatively able to modulate PD processes and to potentially exert a protective effect on IRD progression. We found that the expression modulation in the retina, via AAV-mediated delivery, of the miRNAs miR-204 and miR-181a/b is able to slow down photoreceptor cell death and to improve visual function in different IRD mouse models. Moreover, to identify additional miRNAs with a potentially beneficial role in PD, we are carrying out an unbiased high content screening utilizing an in vitro PD model: we have already identified a few promising hits, currently under characterization. This project may pave the way towards the implementation of gene-independent therapeutic strategies for IRDs that can be used as alternative or in complementation to gene-based approaches.

Modulazione dell'espressione di microRNA: una nuova strategia terapeutica per le malattie retiniche ereditarie?

Le distrofie retiniche ereditarie (IRD) costituiscono una delle più frequenti cause di cecità ad origine genetica nel mondo occidentale. Tra le forme più frequenti e gravi vi sono la retinite pigmentosa (RP), l'Amaurosi Congenita di Leber (LCA), e le distrofie maculari (MD). Attualmente non esistono terapie

efficaci per le IRD e l'elevata eterogeneità genetica e clinica di queste condizioni costituisce un fattore limitante allo sviluppo di terapie appropriate. I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti che controllano processi biologici fondamentali attraverso la regolazione genica. Proprio a causa di questa loro attività e della loro facilità di manipolazione, i miRNA potrebbero rappresentare, in linea di principio, degli ideali agenti terapeutici per le IRD. Lo scopo principale di questo progetto è quello di identificare microRNA in grado di esercitare un effetto protettivo nelle malattie retiniche ereditarie indipendentemente dal difetto genetico responsabile. Utilizzando modelli appropriati, abbiamo dimostrato che i microRNA miR-204 e miR-181 sono in grado di rallentare la progressione di alcune forme di IRD e potrebbero quindi in futuro rappresentare degli strumenti terapeutici per queste condizioni.

1 Karali, M. et al. High-resolution analysis of the human retina miRNome reveals isomiR variations and novel microRNAs. *Nucleic Acids Res* 44, 1525-1540, doi:10.1093/nar/gkw039 (2016).

2 Karali, M and Banfi, S. Non-coding RNAs in retinal development and function. *Hum Genet.* doi: 10.1007/s00439-018-1931-y (2018).

3 Indrieri, A, Carrella, S. et al. miR-181a/b downregulation exerts a protective action on mitochondrial disease models. *EMBO Mol Med* 2019 May;11(5). pii: e8734, doi: 10.15252/emmm.201708734 (2019).

Malattie retiniche ereditarie

Coordinator: Sandro Banfi

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Inherited Retinal Disease

**Keywords:**

microRNAs, inherited retinal disease, noncoding RNAs

## Poster P.16.113

### THERAPEUTIC TARGETING OF MIR-211/EZRIN AXIS PREVENTS RETINAL DEGENERATION IN THE RHOP23H MOUSE MODEL

Intartaglia D., Giamundo G., Salierno F.G., Conte I.\*

*Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ pozzuoli ~ Italy*

Vision relies on the daily endocytic/autophagy-lysosomal degradation of photoreceptor outer segments (POS) within the retinal pigment epithelium (RPE). In RPE, these cellular processes are critically sensitive to light/dark conditions and alterations in lysosomal protein levels result in defects of cell clearance, contributing to eye pathogenesis. While both timing and involvement of these processes are well established, how the light controls these events is largely unknown. To gain insights in this direction, we performed loss of function studies in mouse models. We discover that miR-211 is daily regulator of lysosomal biogenesis in the RPE/retina crosstalk by targeting Ezrin, a cytoskeleton-associated protein essential for the regulation of cell homeostasis. The dysregulation of the light/dark Ezrin expression pattern caused daily impairment of both lysosomal biogenesis and degradation of POS in RPE from miR-211<sup>-/-</sup> mice, which show an age-dependent accumulation of both phagolysosomes containing poorly processed POS and lipofuscin granules, accompanied by a compromised vision. Pharmacological activation of lysosomal biogenesis, through Ezrin inhibition, rescued the miR-211<sup>-/-</sup> phenotype, pointing to a new lysosomal-based therapy to treat retinal degeneration.

Il targeting terapeutico dell'asse miR-211/Ezrin previene la degenerazione retinica nel modello di topo RhoP23H

La visione si basa sulla degradazione quotidiana dei segmenti esterni del fotorecettore (POS) all'interno dell'epitelio pigmentato retinico (RPE). Nella RPE, questi processi cellulari sono molto sensibili alle condizioni di luce / buio ed alterazioni dei livelli delle proteine lisosomiali provocano difetti della clearance cellulare, contribuendo alla patogenesi dell'occhio. Sia i tempi, che il coinvolgimento di questi processi sono ben noti, tuttavia come la luce controlla questi eventi è in gran parte sconosciuto. Per ottenere approfondimenti in questa direzione, abbiamo eseguito studi sulla perdita di funzioni nei modelli di topo. Abbiamo compreso che in microRNA "miR-211" è il regolatore quotidiano della biogenesi lisosomiale nel RPE e nella retina, andando a reprimere la proteina Ezrina, una molecola associata al citoscheletro della cellula essenziale per la regolazione dell'omeostasi cellulare. La perdita di regolazione dell'espressione di Ezrina durante la transizione buio/luce causa una compromissione quotidiana sia della biogenesi lisosomiale sia della degradazione dei POS. Questo induce un accumulo progressivo di prodotti metabolici e catabolici tossici per la cellula, con conseguente accumulo di lipofuscina e compromissione della visione. Abbiamo identificato un farmaco per la riattivazione della biogenesi lisosomiale che riesce a ripristinare la degradazione dei composti tossici attraverso l'inibizione della proteina Ezrin, indicando una nuova terapia per il trattamento delle degenerazioni della retina.

none

Retinite Pigmentosa (RP)

Coordinator: Ivan Conte

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Retinitis Pigmentosa (RP)

**Keywords:**

microRNAs, Retina, autophagy



## Poster P.16.114

### PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR (PEDF) PEPTIDES AS THERAPEUTIC AGENTS FOR INHERITED RETINAL DEGENERATION

Comitato A.\*<sup>[1]</sup>, Becerra P.<sup>[2]</sup>, Marigo V.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Modena and Reggio Emilia ~ Modena ~ Italy, <sup>[2]</sup>National Institute of Health, National Eye Institute ~ Bethesda ~ United States of America

Retinitis pigmentosa (RP) is a form of retinal degeneration (RD) and a major cause for loss of vision during working age. Several genes have been associated with RP. This genetic heterogeneity has hampered the development of therapeutic interventions. Therapy development based on neuroprotection targeting common denominators activated in different forms of RD may benefit a large cohort of patients. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a natural protein in the eye with potent retinoprotective properties and high potential to be applied in retinal degeneration therapeutics.

We have characterized the molecular pathways targeted by PEDF in murine models of RD and found that PEDF acts on PMCA calcium pumps, present at the plasma membrane of rod photoreceptors, facilitating the decrease of intracellular calcium, a key player in photoreceptor cell death (1). Reduced levels of intracellular calcium limit the activation of calpains, calcium regulated proteases, that during degeneration activate Bax and the Apoptosis Inducing Factor (AIF) as triggers of photoreceptor cell death (2).

Given that smaller molecules can be more permeable and facilitate delivery with limited side effects, likely caused by other regions of the entire molecule, we tested small peptides, derived from the neurotrophic region of PEDF, that retain binding affinity for PEDF receptor. This study identified a small peptide of 17 amino acids, with a mutation in the histidine 105 into an alanine (17mer[H105A]), with enhanced neuroprotective activity compared to PEDF (3). We have delivered the 17mer[H105A] in the retina of murine models of RP via an AAV vector, a virus recently approved for gene therapy in the eye. The neuroprotective effects of intravitreal or subretinal injections of the therapeutic virus were analyzed histologically and electrophysiologically. The promising results prompt us to focus our future studies in the identification of an appropriate delivery system for the 17mer[H105A] peptide.

Peptidi derivati da Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF) come agenti terapeutici per la degenerazione retinica ereditaria

La retinite pigmentosa (RP) è una forma di degenerazione retinica (RD) ed è la maggior causa di perdita della vista durante l'età lavorativa. Vari geni sono stati associati a RP e questa eterogeneità genetica è stata d'ostacolo allo sviluppo di protocolli terapeutici. Lo sviluppo di approcci terapeutici basati sulla neuroprotezione che bersaglia meccanismi molecolari comuni attivati nelle diverse forme di RD può venire a vantaggio di un grande numero di pazienti. Il Pigment epithelium-derived factor (PEDF) è una proteina naturale negli occhi con potenti proprietà retinoprotettive e con buona potenzialità di essere applicato nella terapia delle degenerazioni retiniche.

Abbiamo caratterizzato i meccanismi molecolari bersagliati da PEDF nei modelli murini di RD e abbiamo scoperto che PEDF agisce sulle pompe del calcio, presenti sulla membrana plasmatica dei bastoncelli, facilitando la riduzione del calcio e delle molecole che mediano la degenerazione dei fotorecettori durante la progressione della malattia (1-2). Poiché piccole molecole possono essere più permeabili e presentare limitati effetti collaterali che possono derivare da un'intera molecola, abbiamo

saggiato piccoli peptidi contenenti la regione con attività neurotrofica del PEDF. Questo studio ha identificato un piccolo peptide di 17 aminoacidi, 17mer[H105A], con aumentata attività neuroprotettiva rispetto al PEDF (3). Abbiamo veicolato il PEDF 17mer[H105A] con un virus AAV, un tipo virale approvato per la terapia genica nell'occhio. I dati preliminari di neuroprotezione sono promettenti e ci spingono a focalizzare gli studi futuri sull'identificazione di un sistema di veicolazione del peptide 17mer[H105A] nella retina.

1. Comitato A., Subramanian P., Turchiano G., Montanari M., Becerra S.P., Marigo V. (2018) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) hinders photoreceptor cell death by reducing intracellular calcium in the degenerating retina. *Cell Death & Disease* 9: 560.
2. Comitato A., Schioli D., Montanari M., Marigo V. (2019) Calpain Activation Is the Major Cause of Cell Death in Photoreceptors Expressing a Rhodopsin Misfolding Mutation. *Molecular Neurobiology*
3. Kenealey J., Subramanian P., Comitato A., Bullock J, Keehan L., Polato F., Hoover D., Marigo V., Becerra S.P. (2015) Small Retinoprotective Peptides Reveal a Receptor Binding Region on Pigment Epithelium-derived Factor. *Journal of Biological Chemistry* 290:25241-25253.

Retinite Pigmentosa (RP)

Coordinator: Valeria Marigo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19113

**Disease Name:**

Retinitis Pigmentosa (RP)

**Keywords:**

Neuroprotection, photoreceptor, PEDF

## Poster P.16.115

### INTEIN-MEDIATED PROTEIN TRANS-SPLICING EXPANDS ADENO-ASSOCIATED VIRUS TRANSFER CAPACITY IN THE RETINA

**Tornabene P.\*<sup>[1]</sup>**, Trapani I.<sup>[1]</sup>, Minopoli R.<sup>[2]</sup>, Centrulo M.<sup>[2]</sup>, Lupo M.<sup>[2]</sup>, De Simone S.<sup>[2]</sup>, Tiberi P.<sup>[2]</sup>, Dell'Aquila F.<sup>[2]</sup>, Marrocco E.<sup>[2]</sup>, Iodice C.<sup>[2]</sup>, Iuliano A.<sup>[2]</sup>, Gesualdo C.<sup>[3]</sup>, Rossi S.<sup>[3]</sup>, Giaquinto L.<sup>[2]</sup>, Albert S.<sup>[4]</sup>, Hoyng C.<sup>[5]</sup>, Polishchuk E.<sup>[2]</sup>, Cremers F.<sup>[4]</sup>, Surace E.<sup>[2]</sup>, Simonelli F.<sup>[3]</sup>, De Matteis A.<sup>[2]</sup>, Polishchuk R.<sup>[2]</sup>, Auricchio A.<sup>[6]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli ~ Medical Genetics, Department of Translational medicine, Federico II University, Naples ~ Italy, <sup>[2]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli ~ Italy, <sup>[3]</sup>Eye Clinic, Multidisciplinary Department of Medical, Surgical and Dental Sciences, "Federico II" University ~ Naples ~ Italy, <sup>[4]</sup>Department of Human Genetics and Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center ~ Nijmegen ~ Netherlands, <sup>[5]</sup>Department of Ophthalmology and Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center ~ Nijmegen ~ Netherlands, <sup>[6]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli ~ Department of Advanced Biomedicine, Federico II University, Naples ~ Italy

Retinal gene therapy with AAV vectors is safe and effective, yet it is limited by AAV cargo capacity of about 5 kb. To overcome this limitation we explored the use of intein-mediated protein trans-splicing to reconstitute large proteins in the retina. Inteins work as independent peptides fused to the C- and N-termini of two host proteins (i.e. the two halves of a large protein) and mediate their association in a multistep autocatalytic process.

To test protein trans-splicing in the retina, we generated two AAV vectors separately encoding each of the two halves of either the reporter EGFP protein or large therapeutic proteins flanked by split-inteins. These include ABCA4 and CEP290, respectively defective in Stargardt disease (STGD1) and Leber congenital amaurosis 10 (LCA10), two severe and common inherited blinding diseases. We identified in each protein optimal splitting points for the generation of AAV-intein constructs which take into account both amino acid residue requirements for trans-splicing to occur, as well as the preservation of the native protein domains.

Upon co-administration of both AAV split-intein vectors, full-length proteins were reconstituted in the mouse and pig retina as well as in human retinal organoids derived from induced pluripotent stem cells. Importantly, the levels of large protein reconstitution achieved reduced lipofuscin accumulation and retinal degeneration in the mouse models of STGD1 and LCA10, respectively.

Our data support the use of intein-mediated protein trans-splicing in combination with AAV subretinal delivery for gene therapy of inherited blindness due to mutations in large genes.

Il trans-splicing proteico mediato dalle inteine espande la capacità di trasferimento del virus adeno-associato nella retina.

La terapia genica retinica con vettori adeno-associati (AAV) è sicura ed efficace, tuttavia è limitata da una capacità di carico dei vettori AAV di circa 5 kb. Per superare questa limitazione abbiamo esplorato l'uso di un meccanismo di ricostituzione proteico mediato dalle inteine per ricomporre nella retina, proteine di grandi dimensioni. Le inteine funzionano come peptidi indipendenti fusi alle estremità C e N di due proteine ospiti (cioè le due metà di una grande proteina) e mediano la loro associazione in un processo autocatalitico a più fasi.

Per testare il trans-splicing delle proteine nella retina abbiamo generato due vettori AAV che

codificano separatamente ciascuna delle due metà della proteina reporter EGFP o di grandi proteine terapeutiche affiancate da una metà inteina. Queste proteine sono ABCA4 e CEP290, rispettivamente mutati nella malattia di Stargardt (STGD1) e amaurosi congenita di Leber di tipo 10 (LCA10), due gravi e comuni malattie ereditarie che inducono cecità. In ogni proteina abbiamo identificato i punti di rottura ottimali per la generazione dei costrutti AAV-intein che tengono conto sia dei requisiti dei residui amminoacidici necessari per il trans-splicing, sia della conservazione dei domini delle proteine native.

A seguito della co-somministrazione di entrambi i vettori AAV split-intein, le proteine a lunghezza intera sono state ricostituite nella retina di topo, maiale e negli organoidi retinici umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte. È importante sottolineare che i livelli della proteina ricostituita sono sufficienti a ridurre l'accumulo di lipofusina e la degenerazione della retina rispettivamente nei modelli murini di STGD1 e LCA10.

I nostri dati supportano l'uso del meccanismo di ricostituzione delle proteine mediata dalle inteine in combinazione con la somministrazione subretinica dei vettori AAV per la terapia genica della cecità ereditaria dovuta a mutazioni in geni di grandi dimensioni.

None

Sindrome di Stargardt, Amaurosi congenita di Leber di tipo 10

Coordinator: Alberto Auricchio

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Stargardt Disease, Leber Congenital Amaurosis 10

**Keywords:**

Inherited retinal disease, AAV intein, Gene therapy

## 17\_Genetic gastroenterological disease

## Poster P.17.116

### DISCOVERING MOLECULAR DEFECTS OF SEVERE GUT DYSFUNCTION: NEW ABNORMALITIES UNDERLYING CHRONIC INTESTINAL PSEUDO-OBSTRUCTION (CIPO)

Bonora E.<sup>\*[1]</sup>, Bianco F.<sup>[1]</sup>, De Giorgio R.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Medical and Surgical Sciences ~ Bologna ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Medical Sciences ~ Ferrara ~ Italy

CIPO is the most severe form of a wide spectrum of functional gastrointestinal (GI) disorders affecting the integrity of the intestinal neuro-muscular compartment. CIPO is characterized by a severe impairment of gut propulsion mimicking a mechanical sub-occlusive disease in the absence of any anatomical cause of gut obstruction.

Few gene mutations have been so far identified, but most cases remain genetically unsolved. We identified a novel recessive CIPO forms due to mutations in RAD21. RAD21 is a cohesin protein regulating many cellular functions including central and enteric neurons. We studied RAD21 expression in mouse and human intestine showing that RAD21 is expressed in subsets of cholinergic neurons (Bianco et al, 2018). We are currently evaluating RAD21 localization in the conditional rad21A626T mice and studying the molecular mechanisms leading to GI impairment by morpho-functional assessments (i.e., gut transit/contractility and stool production coupled to ENS marker and transcriptional analyses at different developmental stages) in this conditional mouse developed in collaboration with S. Gibbons (Mayo Clinic).

Gene defects in non-RAD21 mutated patients were assessed via whole exome sequencing (WES). Four peripheral neuropathic CIPO patients, one with gut hypoganglionosis and seven patients from 3 independent families with severe gut dysmotility (i.e. CIPO) and leukoencephalopathy, were analyzed. We identified new de novo changes in B3GAT2 and SMC3, a rare SCN11A change, novel biallelic changes in LIG3. B3GAT2 is implicated in neuronal migration (Gouveia et al, 2012), SMC3 binds to RAD21 (Deardoff et al, 2007), SCN11A/Nav1.9 sodium channel subunit is associated to visceral pain, with null mice exhibiting gut dysmotility (Hockley et al, 2016, Copel et al, 2013). LIG3 controls DNA repair in nuclei and mitochondria (Tomkinson et al, 2013). NGS in the probands revealed six compound heterozygous variants (family 1 p.K537N, p.G964R; family 2 p.R267Ter, p.C999Y; family 3 p.P609L, p. R811Ter) in LIG3, which encodes the DNA ligase III involved in nuclear and mitochondrial DNA (mtDNA) maintenance. LIG3 mutations affected highly conserved residues, generating inactive proteins or a severe decrease in protein amount. lig3 ablation in zebrafish reproduced brain alterations and impaired gut transit. LIG3 mutations induced a profound mitochondrial dysfunction, with impaired mtDNA maintenance and repair due to reduced ligase activity. LIG3 mutations cause a severe mitochondrial impairment leading to a clinical phenotype dominated by gut neuro-muscular dysmotility and leukoencephalopathy.

We designed a sequencing panel for these genes and analyzed 115 CIPO cases (86 Italian, 29 Swedish) identifying rare/novel changes, including a stop codon in B3GAT2. Our data showed increased frequency of damaging variants in CIPO vs controls (ExAc, European) in SCN11A (3.28 vs 0.97%;P=0.0323). Functional studies are ongoing to characterize these CIPO variants.

Lo studio dei difetti molecolari nella pseudo-ostruzione intestinale cronica: identificazione di nuove alterazioni genetiche e funzionali

Abstract

La pseudo-ostruzione intestinale cronica (POIC) è una forma molto severa di disordine funzionale

della motilità intestinale, e mima una sub-occlusione intestinale in assenza di una causa meccanica di ostruzione. Fino ad oggi sono state identificate alcune forme a base genetica, ma nella maggior parte dei casi non sono note le cause. Il nostro gruppo di ricerca ha identificato una forma recessiva di POIC dovuta a mutazioni nel gene RAD21, che codifica per una subunità proteica della coesina, complesso coinvolto in trascrizione e replicazione del DNA. Abbiamo mappato l'espressione di RAD21 nell'intestino, in topo e uomo, identificando un sottogruppo di neuroni colinergici come co-espressanti RAD21 (Bianco et al, 2018). Stiamo studiando l'espressione e localizzazione di RAD21 nel topo condizionale rad21A626T e valutando i meccanismi molecolari che portano al severo blocco di motilità intestinale (contrattilità e motilità intestinale, produzione di feci) insieme ai marcatori del sistema nervosa enterico, in collaborazione con S. Gibbons (Mayo Clinic).

Abbiamo quindi analizzato l'intero esoma (WES) nei pazienti non mutati in RAD21, selezionati in base alla presenza di POIC associate a: neuropatia periferica (4 casi), ipoganglionosi (1 caso) e POIC con leucoencefalopatia (3 famiglie affette). Abbiamo identificato nuove mutazioni de-novo in B3GAT2 e SMC3, mutazioni missenso in SCN11A, e mutazioni recessive in LIG3. B3GAT2 è coinvolto nella migrazione neuronale (Gouveia et al, 2012), SMC3 lega RAD21 (Deardoff et al, 2007), SCN11A/Nav1.9 è una subunità del canale del sodio collegata a dolore intestinale e dismotilità intestinale (Hockley et al, 2016, Copel et al, 2013). LIG3 codifica per la DNA Ligasi III che regola la riparazione del DNA nei nuclei e nei mitocondri. I nostri studi funzionali in vitro e in vivo hanno rivelato che le mutazioni in LIG3 determinano una severa alterazione della funzionalità mitocondriale, con severa deplezione del DNA mitocondriale dovuta all'assenza di attività della ligasi. Questo si traduce in un quadro clinico dominato da POIC e leucoencefalopatia nelle pazienti delle tre famiglie analizzate. Abbiamo generato un target panel per sequenziare i geni risultati mutati dall'analisi dell'esoma ed abbiamo analizzato ulteriori 115 casi di POIC (86 Italiani, 29 Svedesi), identificando nuovi o rari cambi, tra cui uno stop-codon prematuro in B3GAT2 ed un aumento nella frequenza di varianti dannose in SCN11A nei pazienti POIC rispetto ai controlli (3.28 vs 0.97%;P=0.0323). Studi funzionali sono in corso per analizzare l'effetto di tali varianti.

Bianco et al., 2018.

Copel et al., 2013.

Deardoff et al., 2007.

Gouveia et al., 2012.

Hockley et al., 2016.

Tomkinson et al., 2013.

Pseudo-ostruzione intestinale cronica

Coordinator: Elena Bonora

Partners: Francesca Bianco, Roberto De Giorgio

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15171

**Disease Name:**

Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction

**Keywords:**

CIPO, ENS, mitochondria



## 18\_Genetic hematologic disease

## Poster P.18.117

### DEFINING HEMATOPOIESIS IN BETA-THALASSEMIA PATIENTS AND AFTER GENE THERAPY

Lidonnici M.R.\*<sup>[1]</sup>, Scaramuzza S.<sup>[1]</sup>, Rossi C.<sup>[1]</sup>, Tiboni F.<sup>[1]</sup>, Ciceri F.<sup>[2]</sup>, Aiuti A.<sup>[3]</sup>, Marktel S.<sup>[2]</sup>, Ferrari G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Haematology and BMT Unit IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Pediatric Immunohematology IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy

Beta-thalassemia (Bthal) is a genetic disorder due to mutations in the  $\beta$ -globin gene, leading to a reduced or absent production of HbA, which interferes with erythroid cell maturation and limits red cell production. Patients are affected by severe anemia, hepatosplenomegaly, and skeletal abnormalities due to rapid expansion of the erythroid compartment in bone marrow (BM) caused by ineffective erythropoiesis. In a classical view of hematopoiesis, the blood cell lineages arise via a hierarchical scheme starting with multipotent stem cells that become increasingly restricted in their differentiation potential through oligopotent and then unipotent progenitors. Recently, purification strategies based on differential expression of CD49f and CD90 surface molecules enrich for long-term (CD49f+) and short-term (CD49f-) repopulating hematopoietic stem cells (HSCs), with distinct cell cycle properties, but similar myeloid (My) and lymphoid potential. Recent work has proposed that erythroid (Ery) and megakaryocytic (Mk) fates branch off directly from CD49f- cells. A general perturbed and stress condition is present in the thalassemic BM microenvironment, which is expected to have impact non only on erythropoiesis but also on hematopoiesis. Thus, to address which model of hematopoiesis/erythropoiesis occurs in Bthal, we defined by immunophenotype analysis the lineage commitment in patients affected by the pathology compared to healthy donors. Furthermore, in patients treated in the therapy protocol TIGET BTHAL (#NCT02453477) this type of analysis allowed to study the features of reconstituted hemato/erythropoiesis by gene-modified transplanted CD34+ cells. Initial results showed differences in the primitive compartment with an increased proportion of multipotent progenitors in Bthal patients compared to healthy donors. We were also able to unveil age-related differences, thanks to the availability of adult and pediatric subjects' samples. By subjecting the classically defined progenitor subsets to a new cell sorting scheme, that efficiently resolved My, Ery, and Mk lineage fates, we quantified the newly identified My and Ery subsets within the CD34+CD38+ compartment and found a reduction of Ery subsets in Bthal samples. Moreover, in gene therapy treated patients we found fluctuations in the contribution of HSC and MPP to the hematopoiesis during follow up. Future RNA-seq analysis, performed on HSC and derived progenitors, will delineate the transcriptional networks governing hematopoiesis in thalassemia.

Studio dell'emopoiesi in pazienti talassemici e dopo terapia genica

Beta-talassemia (Bthal) è una malattia genetica dovuta a mutazioni nel gene beta-globina, che porta una ridotta o assente produzione di HbA, che interferisce con la maturazione delle cellule eritroidi e produzione di globuli rossi. I pazienti sono affetti da grave anemia, epatosplenomegalia e anomalie scheletriche a causa della rapida espansione del compartimento eritroide nel midollo osseo dovuta a eritropoiesi inefficace. Nella visione classica dell'ematopoiesi, le cellule del sangue vengono prodotte, attraverso uno schema gerarchico, a partire da cellule staminali multipotenti che diventano sempre più limitate nel loro potenziale di differenziamento attraverso progenitori oligopotenti e poi unipotenti. Recentemente, strategie di purificazione basate sull'espressione differenziale di molecole di superficie CD49f e CD90 sono in grado di isolare cellule staminali ematopoietiche (CSE) con capacità

ripopolante a lungo termine (CD49f+) e a breve termine (CD49f-), con proprietà diverse nel ciclo cellulare, ma stesso potenziale di differenziamento mieloide (My) che linfoide. Recenti lavori hanno proposto che i "lineages" eritroide (Ery) e megakaryocitico (Mk) derivino direttamente dalle CSE 49f+. Il midollo osseo dei pazienti affetti da questa malattia è caratterizzato da una condizione perturbata e da stress il cui impatto sull'eritropoiesi è risaputo, mentre sull'ematopoiesi è per lo più sconosciuto. Col fine di poter delineare il modello gerarchico ematopoietico in talassemia, abbiamo definito, mediante analisi immunofenotipica, il processo di differenziamento nei diversi "lineages" maturativi sia in pazienti affetti da questa patologia che in donatori sani. Inoltre, questo tipo di analisi è stata effettuata nei pazienti trattati in un protocollo di terapia genica (TIGET-BTHAL, #NCT02453477) e ci ha permesso di studiare la ricostituzione ematopoietica delle cellule CD34+ trasdotte trapiantate. Risultati preliminari hanno mostrato differenze nel compartimento staminale con una maggiore percentuale di progenitori multipotenti nei pazienti talassemici rispetto ai donatori sani. Siamo stati anche in grado di valutare differenze legate all'età, grazie alla disponibilità di campioni di soggetti adulti e pediatrici. Analizzando i progenitori ematopoietici con un nuovo schema di "sorting" in grado di risolvere in modo efficiente il differenziamento My, Ery e Mk, abbiamo quantificato nuovi progenitori My ed Ery all'interno del compartimento CD34+CD38+ e abbiamo trovato una riduzione delle popolazioni Ery nei campioni Bthal. Inoltre, nei pazienti trattati con la terapia genica sono state osservate fluttuazioni nel contributo di CSE e MPP all'ematopoiesi durante il follow-up. In futuro, analisi di RNA-seq eseguita su CSE e sui progenitori delineerà i processi trascrizionali che governano l'ematopoiesi in talassemia.

no

Beta-Talassemia

Coordinator: Giuliana Ferrari

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16A04

**Disease Name:**

Beta-Thalassemia

**Keywords:**

thalassemia, hematopoietic stem cells, erythropoiesis

## Poster P.18.118

### REGULATION OF HEMATOPOIESIS IN NORMAL AND STRESSED CONDITIONS

Aprile A.\*<sup>[1]</sup>, Lidonnici M.R.<sup>[1]</sup>, Gulino A.<sup>[2]</sup>, Storto M.<sup>[1]</sup>, Villa I.<sup>[3]</sup>, Beretta S.<sup>[1]</sup>, Merelli I.<sup>[1]</sup>, Rubinacci A.<sup>[3]</sup>, Ponzoni M.<sup>[4]</sup>, Marktel S.<sup>[5]</sup>, Tripodo C.<sup>[2]</sup>, Ferrari G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Tumor Immunology Unit, Department of Health Sciences, University of Palermo ~ Palermo ~ Italy, <sup>[3]</sup>Bone Metabolism Unit, Division of Genetics and Cell Biology, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[4]</sup>Pathology Unit, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[5]</sup>Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy

Over decades the research on pathophysiology and therapeutic solutions for  $\beta$ -thalassemia (BT) has been mostly focused on erythropoiesis. However, ineffective erythropoiesis and secondary alterations, as abnormal regulation of bone metabolism, iron overload and hormonal factors, induce changes in the BM homeostasis, thus having an impact on the BT bone marrow (BM) microenvironment. As hematopoietic stem cells (HSC) are regulated by signals from the BM niche, we hypothesized that an altered BM milieu might affect BT HSC-niche crosstalk and potentially the outcome of therapeutic HSC transplantation.

We investigated hematopoiesis in thalassemic Hbbth3/+ (th3) mutant mice and we found lower frequency, reduced quiescence and reconstituting potential of HSC, as compared to normal controls. th3 HSC have impaired self-renewal, which is rescued upon transplantation in a normal recipient niche, proving an active role of the BM niche environment. Preliminary morphological and molecular analysis revealed that stromal and hematopoietic components of the niche are altered in th3 mice. Guided by the clinical evidence of osteoporosis in a significant proportion of patients affected by BT, we focused on the role of bone cells in supporting HSC and we found defective osteoblast (OB) activity with decreased levels of parathyroid hormone (PTH). The low PTH alters th3 OB function and reduces expression of the Notch-ligand Jag-1 by the BM stroma. This consequently impairs the activation of Notch1 by HSC, therefore affecting their activity. Administration of PTH is sufficient to restore the stromal niche and reestablish the quiescent HSC pool, with in vivo re-activation of Jag1-Notch1 signaling. Since we found in BT additional abnormalities in the hematopoietic component of the BM, as defective maturation of megakaryocytes (Mk) and reduced circulating levels of thrombopoietin (TPO), we hypothesized the contribution of other factors to the impaired hematopoiesis. As both Mk and TPO have been reported to play a key role in regulating the fate of HSC, we are currently investigating the molecular causes of BT dysmegakaryopoiesis and we will unravel the Mk-HSC crosstalk. Importantly, the reduced HSC quiescence, impaired stromal niche and defective Mk maturation were confirmed in samples from BT patients, thus highlighting the clinical relevance of our findings.

Further investigation will unravel the multiple molecular mechanisms that affect in trans BT HSC functions in the complexity of the stressed BM microenvironment. Our results uncover a defect of HSC in BT, induced by an altered BM microenvironment and unveil underexplored mechanisms in the pathophysiology of the disease, with a potential impact on improving transplantation and gene therapy approaches.

Negli ultimi decenni lo studio della patofisiologia e degli approcci terapeutici della  $\beta$ -talassemia (BT) si sono concentrati soprattutto sull'eritropoiesi. Tuttavia, l'eritropoiesi inefficace e difetti secondari della malattia, quali l'alterata regolazione del metabolismo osseo, il sovraccarico marziale e fattori ormonali,

inducono cambiamenti nell'omeostasi del midollo osseo (MO) con un impatto sul microambiente. Poichè le cellule staminali ematopoietiche (CSE) sono regolate dai segnali provenienti dalla nicchia del MO, abbiamo ipotizzato che un alterato ambiente midollare possa influenzare le interazioni tra CSE e nicchia e potenzialmente l'esito del trapianto di CSE.

Abbiamo analizzato l'ematopoiesi talassemica nel modello murino Hbbth3/+ (th3) e abbiamo osservato una minore frequenza, ridotta quiescenza e potenziale di ricostituzione delle CSE, rispetto agli animali normali di controllo. Le CSE BT presentano un'alterata capacità di automantenimento che viene recuperata dopo trapianto in una nicchia normale, dimostrando quindi un ruolo attivo dell'ambiente del MO. Analisi morfologiche e molecolari preliminari hanno rivelato che le componenti stromali ed ematopoietiche della nicchia risultano alterate nei topi th3. Guidati dall'evidenza clinica di osteoporosi in una quota significativa di pazienti BT, ci siamo concentrati sul ruolo delle cellule dell'osso nel supportare le CSE e abbiamo rilevato un'attività difettiva degli osteoblasti (OB) BT associata a livelli ridotti di ormone paratiroideo (PTH). Il basso PTH altera la funzione degli OB th3 e riduce l'espressione del ligando di Notch Jag1 da parte dello stroma del MO. Questo di conseguenza compromette l'attivazione di Notch1 nelle CSE, alterando la loro funzione. La somministrazione di PTH è sufficiente a recuperare la nicchia stromale e a ristabilire la quiescenza delle CSE BT, attraverso la riattivazione in vivo del segnale Jag1-Notch1. Poiché abbiamo trovato ulteriori anomalie nella componente ematopoietica del MO, quali un difetto nella maturazione dei megacariociti (Mk) BT e ridotti livelli di trombopoietina (TPO), abbiamo ipotizzato il contributo di altri fattori all'alterata ematopoiesi. Dal momento che sia i Mk che il TPO hanno un ruolo chiave nella regolazione delle CSE, stiamo analizzando le cause della dismegacariopoiesi BT e l'interazione tra Mk e CSE in BT. Abbiamo confermato la ridotta quiescenza delle CSE, alterazioni della nicchia stromale e difetti nella maturazione dei Mk nei campioni di pazienti talassemici, evidenziando quindi la rilevanza clinica dei nostri risultati.

Ulteriori studi sveleranno i molteplici meccanismi molecolari che agiscono in trans sulle funzioni delle CSE BT nella complessità dei segnali di stress del MO. I nostri dati rivelano un difetto delle CSE BT indotto da un alterato microambiente del MO e scoprono meccanismi sconosciuti della patofisiologia della malattia con un potenziale impatto sul miglioramento degli approcci di trapianto e di terapia genica.

No

Beta-Talassemia

Coodinator: Giuliana Ferrari

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16A03

**Disease Name:**

Beta-Thalassemia

**Keywords:**

Beta-thalassemia, Hematopoietic stem cells, Bone marrow microenvironment

## Poster P.18.119

### GENE THERAPY FOR THE TREATMENT OF ADULT AND PEDIATRIC PATIENTS AFFECTED BY TRANSFUSION DEPENDENT BETA-THALASSEMIA

**Scaramuzza S.**<sup>[4]</sup>, Markt S.<sup>[5]</sup>, Giglio F.<sup>[5]</sup>, Cicalese M.P.<sup>[6]</sup>, Lidonnici M.R.<sup>[4]</sup>, Rossi C.<sup>[4]</sup>, Calbi V.<sup>[6]</sup>, Maser N.<sup>[7]</sup>, D'Angelo E.<sup>[1]</sup>, Mirra N.<sup>[1]</sup>, Origa R.<sup>[8]</sup>, Tartaglione I.<sup>[2]</sup>, Perrotta S.<sup>[2]</sup>, Viarengo G.<sup>[3]</sup>, Santoleri L.<sup>[9]</sup>, Milani R.<sup>[9]</sup>, Gattillo S.<sup>[9]</sup>, Calabria A.<sup>[4]</sup>, Montini E.<sup>[4]</sup>, Graziadei G.<sup>[10]</sup>, Naldini L.<sup>[4]</sup>, Cappellini M.D.<sup>[10]</sup>, Aiuti A.<sup>[6]</sup>, Ciceri F.<sup>[5]</sup>, Ferrari G.<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>Pediatric Clinic/DH Fondazione IRCCS Ca' Granda ~ MILAN ~ Italy, <sup>[2]</sup>UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA CAMPANIA LUIGI VANVITELLI ~ NAPLES ~ Italy, <sup>[3]</sup>IMMUNOHEMATOLOGY AND TRANSFUSION MEDICINE SERVICE FONDAZIONE IRCCS POLICLINICO SAN MATTEO ~ PAVIA ~ Italy, <sup>[4]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ MILAN ~ Italy, <sup>[5]</sup>Haematology and BMT Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ MILAN ~ Italy, <sup>[6]</sup>Pediatric Immunohematology, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ MILAN ~ Italy, <sup>[7]</sup>Pediatric Department University of Milano-Bicocca, San Gerardo Hospital ~ MILAN ~ Italy, <sup>[8]</sup>Department of Biomedical Science and Biotechnology University of Cagliari ~ CAGLIARI ~ Italy, <sup>[9]</sup>Blood Transfusion Service, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ MILAN ~ Italy, <sup>[10]</sup>Rare Disease Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda ~ MILAN ~ Italy

Beta-thalassemia is a genetic disorder due to mutations in the beta-globin gene causing reduced or absent production of HbA, leading to severe anemia and transfusion dependence.

The only curative treatment is represented by allogeneic bone marrow transplantation (BMT), available for a minority of patients and associated with risk of complications and mortality. Gene therapy could represent an alternative to allogeneic BMT with the potential advantages of using autologous cells, tailored conditioning with no need for immune suppression and no risk of GVHD or rejection.

In 2015 we started a phase I/II gene therapy clinical trial (NCT02453477) based on the autologous transplantation of mobilized hematopoietic stem cells engineered by GLOBE lentiviral vector, expressing a transcriptionally regulated human beta-globin gene. Patients received a myeloablative reduced intensity conditioning for efficient engraftment of corrected cells. The route of administration of genetically-engineered cells is intraosseus injection in iliac crests, for enhancing engraftment and minimizing first-pass intravenous filter.

The clinical study foresees treatment of 10 patients: 3 adults followed by 7 minors, with a staggered enrolment strategy based on evaluation of safety and preliminary efficacy in adult patients by an independent data safety monitoring board before inclusion of pediatric subjects.

Up to now, nine patients (3 adults and 6 minors) with different genotype ( $\beta^0/\beta^0$ ,  $\beta^+/\beta^+$  and  $\beta^0/\beta^+$ ) have been treated with GLOBE-transduced CD34+ cells with a median cell dose of  $19.5 \times 10^6$  CD34+ cells/kg containing a range of transduced clonogenic progenitors from 38 to 77% (median 60%) and a mean VCN/ genome of  $0.93 \pm 0.27$ . The procedure was well tolerated by all patients, with no product-related adverse events. As of July 2019, median follow-up is 36.8 months (range 8-47 months).

A stable multilineage engraftment of genetically modified cells is present in 7 patients with percentage of transduced bone marrow (BM) progenitors ranging from 26 to 79% at the latest follow up time point, with vector-transduced cells detected in multiple lineages, including lymphoid, myeloid and erythroid compartment both from peripheral blood and BM.

The three adult patients had a reduction of transfusion requirement improving their quality of life. Among the pediatric patients, 4 have discontinued transfusion shortly after gene therapy and are transfusion independent at the last follow-up. Two are still receiving regular blood transfusions.

Polyclonal vector integrations profiles have been detected in tested patients with the expected genomic distribution for lentiviral vectors and no evidence of clonal dominance. Long term follow up analysis are ongoing and will provide valuable information on the long-term safety and clinical efficacy of this treatment.

La Beta Talassemia è una malattia genetica causata da mutazioni nel gene della beta globina che porta ad una produzione di emoglobina ridotta o assente con una severa anemia che richiede trasfusioni regolari.

L'unico trattamento risolutivo è il trapianto di midollo osseo, disponibile per una minoranza dei pazienti ed associato a rischi di complicazioni e mortalità. La terapia genica può rappresentare una valida alternativa al trapianto con il vantaggio di usare cellule autologhe, un condizionamento più blando e nessun rischio di rigetto.

Nel 2015 è iniziato un trial clinico di fase I/II (NCT02453477) basato sulla trasduzione di cellule staminali autologhe mobilizzate con G-CSF e plerixafor, ingegnerizzate con il vettore lentivirale GLOBE, che consente l'espressione della beta globina in modo regolato. I pazienti sono stati condizionati con treosulfano e tiotepa per favorire l'attecchimento delle cellule corrette con una tossicità ridotta. Le cellule trasdotte sono infuse per via intraossea bilateralmente nella cresta iliaca, con il proposito di aumentare l'attecchimento e minimizzare il passaggio in organi filtro.

Lo studio clinico prevede il trattamento di 10 pazienti, 3 adulti seguiti da 7 pediatriche, con una strategia di arruolamento regolata da una valutazione preliminare di sicurezza ed efficacia nei pazienti adulti.

Ad ora, 9 pazienti con genotipi differenti ( $\beta^0/\beta^0$ ,  $\beta^+/\beta^+$  and  $\beta^0/\beta^+$ ) sono stati trattati con cellule CD34+ trasdotte con il vettore GLOBE ricevendo una dose cellulare mediana pari a  $19.5 \times 10^6$  CD34+ cells/kg, con una percentuale di trasduzione calcolate nei progenitori clonogenici variabile dal 38 al 77% (mediana 60%) e una media di VCN/genoma di  $0.93 \pm 0.27$ .

La procedura è stata ben tollerata da tutti i pazienti, senza eventi avversi correlati all'infusione del prodotto trasdotto. A luglio 2019, la mediana del follow-up era di 36.8 mesi (da 8 a 47 mesi).

E' presente un attecchimento stabile delle cellule trasdotte in 7 pazienti con una percentuale di trasduzione calcolata sui progenitori purificati dal midollo, tra il 26 e il 79%, con cellule trasdotte presenti in più linee cellulari, incluse cellule linfoidi, mieloidi ed eritroidi sia nel midollo che nel sangue periferico.

I tre pazienti adulti mostrano una riduzione nel fabbisogno trasfusionale con miglioramento generale della qualità della vita. Fra i pazienti pediatriche, 4 hanno interrotto le trasfusioni dopo breve tempo dalla terapia genica e sono tuttora trasfusione indipendenti mentre due continuano ad avere necessità di trasfusioni regolari. Lo studio delle integrazioni del vettore nel genoma mostra un profilo policlonale, con una distribuzione genomica attesa per i vettori lentivirali e senza evidenza di dominanza clonale. Analisi su campioni a tempi più lunghi sono necessarie per fornire ulteriori informazioni sull'efficacia e la sicurezza a lungo termine del trattamento.

Beta-talassemia

Coordinator: Giuliana Ferrari

**Telethon Project (nr):**

SR-TIGET GENE THERAPY FOR BETA THALASSEMIA

**Disease Name:**

Beta-Thalassemia

**Keywords:**

BETA-THALASSEMIA, GENETIC DISEASE, HEMOGLOBIN A



## Poster P.18.120

### DISSECTING CELL SENEESCENCE PROGRAMS IN THE HEMATOPOIETIC COMPARTMENT

Di Micco R.\*

*SR-TIGET ~ Milan ~ Italy*

Cellular senescence is a physiologic stress response program elicited, by DNA damage accumulation and the expression of activated oncogenes. Senescence is characterized by proliferation arrest and by the activation of a senescence-associated secretory phenotype characterized by factors linked to inflammation, proliferation, and modulation of the extracellular matrix, collectively named as SASP. Senescence contributes to tumor suppression and tissue repair. However, accumulation of senescent cells leads to aging and chronic inflammatory pathologies. Despite the well-characterized role of senescence programs in differentiated fibroblasts or epithelial cells, many fundamental aspects of senescence in stem cell physiology remain poorly elucidated. Hematopoietic Stem Cells (HSCs) serve as a lifelong reservoir for mature blood cells. Importantly, the capacity of HSCs to constantly replenish the hematopoietic compartment upon stressors requires active mechanisms that ensure a careful balance between HSC self-renewal potential and differentiation outputs. We dissected the molecular determinants of HSCs response to several senescence-inducing stimuli, including DNA Double Strand Breaks (DSBs) and activated oncogenes. We studied the transcriptional impact of senescence stressors in an unbiased manner and interrogated individual cells within the heterogeneous hematopoietic stem/progenitor population. We also deciphered the complex network of inflammatory SASP by protein arrays and identified potential cytokines/chemokines responsible to transmit senescence signals to neighboring cells in a paracrine fashion. Finally, our mechanistic studies led to the identification of novel therapeutic targets that, when inhibited, counteracted potential detrimental effects of cellular senescence on HSCs functionality and during hematopoietic reconstitution.

La senescenza cellulare è un programma di risposta allo stress suscitato dall'accumulo di danno al DNA ed espressione di oncogeni attivati. Cellule senescenti sono caratterizzatoo dall'arresto della proliferazione e dall'attivazione di un fenotipo secretorio caratterizzato da fattori legati all'infiammazione e alla modulazione della matrice extracellulare, chiamati SASP. La senescenza contribuisce alla soppressione del tumore e alla riparazione dei tessuti. Però, l'accumulo di cellule senescenti porta all'invecchiamento e a patologie infiammatorie croniche. Nonostante il ruolo ben caratterizzato dei programmi di senescenza in fibroblasti o cellule epiteliali, molti aspetti fondamentali della senescenza nell'ambito ematopoietico rimangono da chiarire. Le cellule staminali ematopoietiche (HSC) servono come reservoir delle cellule mature del sangue. Il nostro team studia i meccanismi molecolari della risposta dell'HSC a diversi stimoli che inducono la senescenza, incluso il danno al DNA indotto da nucleasi artificiali per approcci di terapia genica e oncogeni attivati. Utilizzando tecnologie avanzate di trascrittomica, ingegneria genetica e modelli umanizzati di trapianto stiamo identificando nuovi bersagli terapeutici che, se inibiti, possano contrastare i potenziali effetti dannosi della senescenza cellulare sulla funzionalità delle staminali durante la ricostituzione ematopoietica.

Schirotti, Conti et al. Cell Stem Cell 2019

Gnani et al. Aging Cell 2019

Conti and Di Micco Genome Medicine 2018

Malattie delle line cellulari immuno-ematologiche

Coordinator: Raffaella Di Micco

**Telethon Project (nr):**

TGT16E05

**Disease Name:**

Diseases of immune-hematological lineage

**Keywords:**

senescence, stem cells, advanced therapies

## Poster P.18.121

### LIVER-DIRECTED GENE THERAPY WITH LENTIVIRAL VECTORS ACHIEVE NORMAL LEVELS OF CLOTTING FACTOR VIII AND IX IN NON-HUMAN PRIMATES

Milani M.<sup>[1]</sup>, Canepari C.<sup>[1]</sup>, Annoni A.<sup>[1]</sup>, Liu T.<sup>[2]</sup>, Biffi M.<sup>[1]</sup>, Patarroyo-White S.<sup>[2]</sup>, Ayuso E.<sup>[3]</sup>, Peters R.<sup>[2]</sup>, Cantore A.<sup>\*[1]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>SR-Tiget ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Sanofi ~ Waltham ~ United States of America, <sup>[3]</sup>University of Nantes ~ Nantes ~ France

Liver-directed gene therapy with adeno-associated viral (AAV) vectors delivering a clotting factor transgene has shown successful results in adults with hemophilia. However, because AAV vectors do not actively integrate into the host cell genome, they are diluted upon cell division in liver growth, thus challenging their proficient use in pediatric patients. In contrast, lentiviral vectors (LV) integrate into the target cell chromatin and are maintained as cells divide. We have developed LV that achieve stable transgene expression in the liver following systemic administration and allow dose-dependent reconstitution of coagulation factor IX (FIX) activity in mouse and dog models of hemophilia B. We recently generated improved phagocytosis-shielded LV, which, upon intravenous (i.v.) administration to non-human primates (NHP), showed selective targeting of liver and spleen and enhanced hepatocyte gene transfer, reaching up to 300% of normal activity of a human FIX transgene, without signs of toxicity or clonal expansion of transduced cells. In order to apply our gene therapy strategy to hemophilia A, we have codon-optimized the coagulation factor VIII (FVIII) transgene and incorporated a DNA fragment encoding a non-structured XTEN polypeptide, known to increase the half-life and expression level of the payload protein into the B-domain region of FVIII (coFVIII-XTEN). I.v. administration of LV-coFVIII-XTEN to NHP resulted in 60-100% of normal circulating FVIII, with immune suppression. These studies support further pre-clinical assessment and clinical evaluation of liver-directed LV gene therapy in patients with hemophilia.

La terapia genica diretta al fegato con vettori lentivirali permette di raggiungere livelli normali di fattore VIII e IX della coagulazione in primati non umani

La terapia genica diretta al fegato con vettori adeno-associati (AAV) contenenti un transgene di un fattore della coagulazione ha dimostrato risultati molto positivi in pazienti adulti affetti da emofilia. Tuttavia, poiché i vettori AAV non si integrano attivamente nel genoma della cellula ospite, vengono diluiti in seguito alla divisione cellulare durante la crescita del fegato, rendendo così al momento difficile il loro uso nei pazienti pediatrici. Al contrario, i vettori lentivirali (LV) si integrano nella cromatina delle cellule bersaglio e vengono mantenuti anche se le cellule si dividono. Abbiamo sviluppato LV che raggiungono un'espressione stabile del transgene nel fegato dopo la somministrazione sistemica e consentono una ricostituzione dose-dipendente dell'attività del fattore IX (FIX) della coagulazione in modelli di emofilia B di topo e cane. Di recente abbiamo generato LV più resistenti alla fagocitosi, che, dopo la somministrazione endovenosa (i.v.) in primati non umani (NHP), hanno mostrato trasferimento genico selettivo nel fegato e nella milza e hanno migliorato in particolare il trasferimento genico degli epatociti, raggiungendo fino al 300% dell'attività normale di un transgene FIX umano, senza segni di tossicità. Per applicare la nostra strategia di terapia genica all'emofilia A, abbiamo ottimizzato il transgene del fattore VIII della coagulazione (FVIII) e incorporato un frammento di DNA che codifica un polipeptide XTEN non strutturato, noto per aumentare la stabilità e il livello di espressione delle proteine nella regione del dominio B di FVIII (coFVIII-XTEN). Dopo

somministrazione i.v. di LV-coFVIII-XTEN in NHP abbiamo osservato il 60-100% della normale concentrazione di FVIII circolante, seppur durante un periodo di immunosoppressione. Questi studi supportano un'ulteriore valutazione preclinica e una possibile valutazione clinica della terapia genica diretta dal fegato con LV in pazienti con emofilia.

Milani et al., Science Translational Medicine 2019

Emofilia

Coordinator: Luigi Naldini, Alessio Cantore

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16D04

**Disease Name:**

Hemophilia

**Keywords:**

Gene therapy, Liver, Lentiviral vectors

## Poster P.18.122

### CONVENTIONAL DCS AND ENDOGENOUS TRYPTOPHAN DERIVATIVES PREVENT THE DEVELOPMENT OF ANTI-FVIII ANTIBODIES IN HEMOPHILIA A MODEL

Matino D.<sup>[1]</sup>, Gargaro M.<sup>[1]</sup>, De Luca A.<sup>[1]</sup>, Scalisi G.<sup>[1]</sup>, Manni G.<sup>[1]</sup>, Javier Quintana F.<sup>[2]</sup>, Iorio A.<sup>[3]</sup>, Fallarino F.\*<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Perugia ~ Perugia ~ Italy, <sup>[2]</sup>Brigham and Women's Hospital Harvard Medical School ~ Boston (USA) ~ United States of America, <sup>[3]</sup>McMaster University ~ Hamilton ~ Cameroon, <sup>[4]</sup>~ Italy

Hemophilia A is a genetic disorder that manifests itself through an inability to form blood clots within the body. Since this is due to the absence of a clotting protein (factor VIII), the gold-standard treatment is to inject the protein that is missing into the patient's circulation to make up for the deficiency (1). Unfortunately, about 30% of hemophilia A patients develop inhibitors against this infused protein and render the treatment ineffective. The interaction between factor VIII and the body's white blood cells are important for inhibitor generation as well as the tolerance to factor VIII, which is the absence of inhibitor generation to the protein (2). We reported that the inhibitor-positive status was associated with reduced activity of the immune-regulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in dendritic cells (DCs), that promotes regulatory effects via the production of tryptophan catabolites, known as kynurenines. Some of those tryptophan derivatives are endogenous ligands for the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) (3).

In this study, we tested the potential of tryptophan-related AhR ligands for inhibiting the development of anti-FVIII antibodies in hemophilic (F8 KO) mice. To this aim, F8 KO mice hemophilic mice were treated with recombinant human FVIII (rhFVIII) alone or in combination with selected AhR ligands once weekly for four weeks. All mice treated with rhFVIII developed high-titer anti-FVIII antibodies after 4 weeks of treatment.

Administration of specific tryptophan metabolites prevented the generation of anti-FVIII antibodies in almost 80% of F8 KO mice. The protective effect of these AhR ligands was negated by co-administration of the AhR antagonist CH-223191 or in AhR KO mice. Moreover the protective effect was abrogated in mice lacking selected dendritic cell subsets.

Similar results were obtained by administration of engineered gold nanoparticles loaded with the same tryptophan metabolite and rhFVIII. In addition, in the same model we found that treatment with AhR ligands not only suppressed FVIII-specific antibody titers but, resulted in increased protection against specific bacteria and fungi infection.

Thus, these results suggest that the engagement of AhR, by specific tryptophan derivatives in selected DC subsets, may be a possible new strategy to control the immune response to rhFVIII, while protecting against specific infections

Le cellule dendritiche convenzionali e derivati del triptofano inibiscono la formazione di anticorpi anti-FVIII in un modello di emofilia A.

1. Mannucci, P.M., Tuddenham, E.G., 2001. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. The New England journal of medicine 344, 1773-1779.
2. Gringeri, A., Mantovani, L.G., Scalone, L., Mannucci, P.M., 2003. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. Blood 102, 2358-2363.
3. Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M.T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Bicciato, S., Mazza,

E.M., Macchiarulo, A., Vacca, C., Iannitti, R., Tissi, L., Volpi, C., Belladonna, M.L., Orabona, C., Bianchi, R., Lanz, T.V., Platten, M., Della Fazia, M.A., Piobbico, D., Zelante, T., Funakoshi, H., Nakamura, T., Gilot, D., Denison, M.S., Guillemin, G.J., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., Metz, R., Geffard, M., Boon, L., Pirro, M., Iorio, A., Veyret, B., Romani, L., Grohmann, U., Fallarino, F., Puccetti, P., 2014. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* 511, 184-190.

Emofilia

Coordinator: Francesca Fallarino

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17094

**Disease Name:**

Hemophilia

**Keywords:**

tryptophan, Dendritic cells, FVIII

## Poster P.18.123

### FROM COAGULATION TO ANGIOGENESIS: NEW ROLES FOR FVIII IN ENDOTHELIAL FUNCTIONALITY

Olgasi C.<sup>[1]</sup>, Famà R.<sup>[1]</sup>, Walker G.<sup>[1]</sup>, Cucci A.<sup>[1]</sup>, Borroni E.<sup>[1]</sup>, Merlin S.<sup>[1]</sup>, Borsotti C.<sup>[1]</sup>, Oliviero S.<sup>[2]</sup>, Follenzi A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università del Piemonte Orientale ~ Novara ~ Italy, <sup>[2]</sup>Università degli Studi di Torino ~ Torino ~ Italy

Hemophilia A (HA) is a rare bleeding disorder caused by the absence or dysfunction of FVIII protein (1). Based on its residual activity, there are several degrees of severity and spontaneous bleeding episodes can occur more frequently in severe HA patients (2). These bleedings primarily consist of spontaneous hemarthroses that occur without any clear cause (3). Standard therapies are ineffective in preventing recurrent joint bleedings and hemophilic arthropathy development remain one of the main complications in the management of the HA patients (2-5). Moreover, recent studies evaluated the cardiovascular risk in HA patients evidencing an endothelial dysfunction compared to healthy controls (6). The impairment of vessel stability in HA patients is not understood and the impact of this defect related to the absence or low activity of FVIII as never been explored. Our preliminary data show that in severe HA; the endothelium is more permeable than the healthy controls suggesting a role of FVIII in vessel stability relating to spontaneous bleeding without trauma. We have identified significant differences in our HA and healthy endothelial cell (EC) model systems. HA ECs have altered endothelial features with a reduced tubulogenic and migration potential. RNA-seq and proteomic analyses have revealed that HA and healthy ECs display different gene expression and protein profiles. The impaired phenotype was partially attenuated after transduction of HA-ECs with a lentiviral vector (LV) expressing a short form of FVIII deleted for the B-domain (BDD), suggesting its extra-coagulative role, mainly due to B domain, in enhancing vessel stability. To date, very little is known about the differences in the genetic profile between healthy and hemophilic ECs. Such information is crucial in order to understand if key cell targets are missing in HA patients at the cellular level, thus impairing EC functionality. As the vascular network is indispensable for homeostasis in the human body, it is important to understand if FVIII is crucial for EC survival, stability and migration, which will help, shape the future regenerative therapeutic approaches. To elucidate this extra-coagulative role, we will engineer our EC models by gene editing to generate isogenic cells to analyze the transcriptome, epigenetic status and secretome profile in HA and healthy ECs. These cells will be corrected using LV expressing full-length (FL) or BDD-FVIII under the control of the naïve promoter to dissect the involved molecular targets. Using gene and cell therapy approaches we will investigate whether restored FL-FVIII can improve vessel stability in addition to the bleeding defect in a HA mouse model. Therefore, the study of the extracoagulative role of FVIII can offer new therapeutic gene and cell therapy strategies for the management of HA patients and can pave the way for the development of a combined strategy that can result in a more efficient treatment of HA.

Dalla coagulazione all'angiogenesi nuovi ruoli del FVIII nella funzionalità endoteliale

L'emofilia A (HA) è una patologia rara causata dall'assenza o dalla presenza della proteina del FVIII non funzionante. In base all'attività residua del FVIII, si riconoscono diversi gradi di severità della malattia ed episodi di sanguinamento spontaneo possono essere più frequenti nei pazienti con HA grave. Tali sanguinamenti consistono in emartrosi spontanee che avvengono senza una causa definita. Le terapie standard non hanno effetto nel prevenire i sanguinamenti, pertanto l'artropatia rimane una

delle principali complicazioni nel trattamento dei pazienti HA. Inoltre, studi recenti hanno riportato un maggiore rischio cardiovascolare nei pazienti HA rispetto ai sani, evidenziando una disfunzione endoteliale. La causa della differenza nella stabilità dei vasi nei pazienti HA, rispetto ai sani, non è ancora stata compresa e la correlazione tra i sanguinamenti spontanei e la presenza o la bassa attività del FVIII non è ancora stata studiata. I nostri dati preliminari mostrano come, nei pazienti con HA grave, l'endotelio sia più permeabile rispetto ai sani, suggerendo un ruolo del FVIII nella stabilità dei vasi. Infatti, le endoteliali (EC) degli emofilici hanno una ridotta capacità di formare tubuli ed una minore efficienza nella migrazione rispetto alle EC sane. L'analisi dei geni e delle proteine ha evidenziato differenze significative tra le EC HA e quelle sane. Tale fenotipo è parzialmente attenuato dopo la trasduzione con un vettore lentivirale (VL) usato per l'espressione del FVIII deleto del dominio B nelle endoteliali HA, suggerendo un ruolo extra coagulativo, probabilmente legato al dominio B, nel migliorare la stabilità dei vasi. Al momento le differenze nel profilo genico tra le EC sane ed HA non sono conosciute ma tale informazione potrebbe risultare cruciale nell'identificazione della causa dell'instabilità dei vasi nei pazienti HA. Pertanto per elucidare il ruolo extra coagulativo del FVIII, ingegnerizzeremo le EC sane con gene editing per generare cellule isogeniche ed analizzare il trascrittoma, lo stato epigenetico ed il profilo di secrezione nelle EC HA e sane. Tali cellule saranno, inoltre corrette usando un VL contenente il FVIII-B deleto o la forma completa (FL) sotto il controllo del promotore naturale. Utilizzando approcci di terapia genica e cellulare valuteremo se la reintroduzione del FVIII-FL può portare al miglioramento della stabilità dei vasi oltre alla correzione del difetto di coagulazione in modelli murini di malattia. Pertanto, lo studio del ruolo extra coagulativo del FVIII può offrire nuove strategie terapeutiche nel trattamento dei pazienti emofilici ed aprire la strada per lo sviluppo di strategie combinate di terapia cellulare e genica per migliorare il trattamento dell'emofilia A.

(1) J. Graw, H.-H. Brackmann, J. Oldenburg, R. Schneppenheim, M. Spannagl, and R. Schwaab, "Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 6, no. 6, pp. 488–501, 2005.

(2) J. V. Luck, M. Silva, E. C. Rodriguez-Merchan, N. Ghalambor, C. A. Zahiri, and R. S. Finn, "Hemophilic arthropathy," *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. p. 12(4):234-45, 2004.

(3) M. L. Simpson and L. A. Valentino, "Management of joint bleeding in hemophilia," *Expert Review of Hematology*. p. 5(4):459-68, 2012.

(4) K. Knobe and E. Berntorp, "Haemophilia and joint disease: pathophysiology, evaluation, and management," *J. Comorbidity*, vol. 1, pp. 51–59, 2011.

(5) S. S. Acharya, R. N. Kaplan, D. Macdonald, O. T. Fabiyi, D. DiMichele, and D. Lyden, "Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis," *Blood*, vol. 117, no. 8, pp. 2484–2493, 2011.

(6) P. W. Kamphuisen and H. Ten Cate, "Cardiovascular risk in patients with hemophilia," *Blood*. p.123(9):1297-301, 2014.



Emofilia A

Coordinator: Antonia Follenzi

Partner: Salvatore Oliviero

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19201

**Disease Name:**

Hemophilia A

**Keywords:**

Hemophilia A, endothelial cells, vessel stability

## Poster P.18.124

### GENOMIC MECHANISMS OF HUMAN GRANULOPOIESIS: IMPLICATIONS FOR BONE MARROW RECONSTITUTION AFTER GENE THERAPY

Montaldo E.<sup>[1]</sup>, Bianchessi V.<sup>[1]</sup>, Lusito E.<sup>[1]</sup>, Scala S.<sup>[1]</sup>, Basso--Ricci L.<sup>[1]</sup>, Cantaffa C.<sup>[1]</sup>, Barresi S.<sup>[1]</sup>, Barbiera G.<sup>[1]</sup>, Xue E.<sup>[2]</sup>, Messina C.<sup>[2]</sup>, Lazzari L.<sup>[2]</sup>, Tassara M.<sup>[2]</sup>, Milani R.<sup>[2]</sup>, Malabarba L.<sup>[2]</sup>, Gattillo S.<sup>[2]</sup>, Santoleri L.<sup>[2]</sup>, Tresoldi C.<sup>[2]</sup>, Belfiori G.<sup>[2]</sup>, Crippa S.<sup>[2]</sup>, Falconi M.<sup>[2]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Ciceri F.<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>, Ostuni R.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy,

<sup>[2]</sup>IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Rapid regeneration of monocytes and neutrophils upon conditioning is critical for the efficacy and safety of hematopoietic stem cell (HSC) transplantation for haematological diseases. Myelopoiesis is a dynamic process whereby stress signals, such as inflammatory cytokines, can stimulate the production in the bone marrow and release in the blood of immune effector cells. During hematopoietic stress, developing granulocytes are often released prematurely from the bone marrow, leading to the co-existence in circulation of distinct populations of terminally differentiated and immature neutrophils with poorly defined properties. We dissected the immunophenotypic and transcriptional alterations of circulating neutrophils and monocytes in humans undergoing diverse types of hematopoietic stress. We identified commonalities and differences in the cellular and molecular programs of circulating myeloid cells elicited during acute G-CSF exposure, hematopoietic stem cells (HSC) transplantation, as well as during pancreatic cancer. We show that a common output of these types of hematopoietic stress in humans is the elicitation of a heterogeneous population of immature and mature low-density neutrophils (LDN), which comprises a substantial fraction of early unilineage neutrophil precursors with proliferative capacity. Bulk and single-cell transcriptomics revealed critical determinants of neutrophil heterogeneity in the blood. These data should assist in the identification of circulating markers and therapeutic targets associated to stressed hematopoiesis in human disease.

La rapida rigenerazione di neutrofili e monociti dopo condizionamento è essenziale per l'efficacia e la sicurezza del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (CSE). La produzione di queste cellule, o mielopoiesi, è un processo dinamico in cui segnali di stress, quali le citochine infiammatorie, stimolano la proliferazione di precursori nel midollo osseo e il rilascio in circolazione di cellule effettrici dell'immunità innata. In queste condizioni i granulociti sono spesso rilasciati prematuramente e ciò porta alla coesistenza in circolazione di popolazioni distinte di neutrofili con stati di maturazione diversi e le cui proprietà sono poco caratterizzate. In questo studio abbiamo analizzato le alterazioni immunofenotipiche e trascrizionali dei neutrofili e monociti del sangue in pazienti con ematopoiesi stressata, indotta da trattamento acuto con G-CSF, da trapianto di CSE o da tumore del pancreas. Un elemento comune a queste condizioni è il rilascio in circolazione di una popolazione eterogenea di neutrofili a bassa densità (low-density neutrophils, LDN), la quale comprende anche precursori unipotenti con capacità proliferativa. Le nostre analisi del trascrittoma, anche su singola cellula, hanno identificato elementi chiave dell'eterogeneità dei neutrofili del sangue. Questi dati rappresentano un'utile risorsa per l'identificazione di marcatori circolanti e bersagli terapeutici associati a ematopoiesi di emergenza nell'uomo.

Heterogeneity of neutrophils. Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A. Nat Rev Immunol. 2019 Apr;19(4):255-265.

Terapie genica con CSE, Trapianto di CSE

Coordinator: Renato Ostuni  
Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16F04

**Disease Name:**

HSC Gene Therapy, HSC Transplantation

**Keywords:**

Haematopoietic stem cell transplantation, innate immunity, HSC gene therapy

## Poster P.18.125

### MESODERMAL RETINOIC ACID SIGNALING REGULATES THE SPECIFICATION OF HUMAN DEFINITIVE HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS

Scarfò R.<sup>[1]</sup>, Luff S.<sup>[2]</sup>, Maffioletti S.<sup>[1]</sup>, Dege C.<sup>[2]</sup>, Creamer J.P.<sup>[2]</sup>, Choi K.<sup>[2]</sup>, Morris S.<sup>[2]</sup>, Sturgeon C.M.<sup>[2]</sup>, Ditadi A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Milan ~ San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Italy, <sup>[2]</sup>Saint Louis ~ Department of Medicine, Division of Hematology, Washington University in Saint Louis ~ United States of America

Mammalian embryonic hematopoiesis is tightly regulated, both temporally and spatially, and culminates with the emergence of hematopoietic stem cells (HSCs). HSCs derive from hemogenic endothelium cells (HECs) at the onset of definitive hematopoiesis, but the signaling orchestration regulating their specification is not fully understood. To study these events in the human system, we developed a stage-specific human pluripotent stem cells (hPSCs) differentiation approach faithfully recapitulating embryonic hematopoietic development. Using this platform, we described Wnt signaling as a critical positive regulator of the definitive hematopoietic mesoderm that generates clonally multipotent definitive HECs, although devoid of HSC-like potential. While HSCs emergence is Retinoic Acid (RA) signaling-dependent in the mouse embryo, RA manipulation on hPSC-derived HECs failed to yield HSC-like progeny.

This raises the question of the temporal RA requirement for the specification of HSC-competent HECs. Here we show that the expression of ALDH1A2, a key enzyme for RA synthesis, defines two distinct WNT-induced KDR<sup>+</sup> hematopoietic mesodermal populations and segregates with CXCR4<sup>+</sup> cells. Stage-specific activation of RA signaling in KDR<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells elicit the specification of HECs with robust lymphoid, myeloid and erythroid potential. Conversely, the hematopoietic specification of KDR<sup>+</sup>CXCR4<sup>-</sup> cells is completely RA-independent. Mechanistically, we found that ALDH1A2 expression is directly regulated by several morphogens, whose pathways can be manipulated to increase the proportion of KDR<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells expressing ALDH1A2.

Collectively, we have defined the specification of RA-dependent HECs and their mesodermal precursors. These findings are pivotal to study the molecular requirements for HSC emergence and provide the basis for their in vitro generation.

L'attivazione della via di segnalazione dell'Acido Retinoico regola la specificazione dei progenitori ematopoietici umani dalle cellule staminali pluripotenti umane

L'ematopoiesi, ossia la formazione delle cellule del sangue e del sistema immunitario, è un processo finemente regolato, a livello spazio-temporale, durante lo sviluppo embrionale umano. È un processo complesso, a vari stadi, che culmina con lo sviluppo delle cellule staminali ematopoietiche (HSC), in grado di generare tutte le cellule del sistema immunitario presenti nell'adulto. Avere la possibilità di generare in laboratorio le HSC, ci permetterebbe di possedere un'infinita risorsa da utilizzare per scopi di medicina rigenerativa, studio di patologie ematologiche e terapia genica. A questo scopo, il nostro obiettivo è di studiare lo sviluppo ematopoietico umano utilizzando un fine sistema basato sulle cellule staminali pluripotenti umane, cellule da cui è possibile generare qualsiasi cellula dell'organismo. Questa piattaforma ci permette di studiare i meccanismi alla base della formazione delle HSC con

l'obiettivo di ricapitolare ciò che avviene a livello embrionale in laboratorio. In particolar modo, i nostri dati evidenziano che l'attivazione della via di segnalazione dell'Acido Retinoico in uno specifico stadio dello sviluppo embrionale, sia fondamentale per generare cellule ematopoietiche. Ipotizziamo che l'attivazione stadio-specifica della via dell'Acido Retinoico sia cruciale per specificare la formazione delle HSC. I nostri studi si ripropongono di identificarne i meccanismi molecolari necessari, ponendo le basi necessarie per la generazione delle HSC in laboratorio.

Ditadi A, Sturgeon CM, Tober J, et al. Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. *Nat Cell Biol.* 2015;17(5):580-91.

Ditadi A, Sturgeon CM. Directed differentiation of definitive hemogenic endothelium and hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells. *Methods.* 2016 May 15;101:65-72. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.10.001. Epub 2015 Oct 9. PubMed PMID: 26439174.

Chanda B, Ditadi A, Iscove NN, Keller G. Retinoic acid signaling is essential for embryonic hematopoietic stem cell development. *Cell.* 2013 Sep 26;155(1):215-27.

Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, Kennedy M, Keller G. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014 Jun;32(6):554-61. doi: 10.1038/nbt.2915. Epub 2014 May 18.

Sindrome da insufficienza congenita del midollo osseo

Coordinator: Ditadi Andrea

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16C04

**Disease Name:**

Inherited Bone Marrow Failure

**Keywords:**

Hematopoiesis, Retinoic Acid, Development

## Poster P.18.126

### MODELLING THE EMBRYONIC ORIGIN OF OMENN SYNDROME AUTO-REACTIVE T-CELLS

Cascione S.\*, Rigoni R., Squadrito M., Villa A., Ditadi A.

*Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ Milano ~ Italy*

Omenn Syndrome (OS) comprises a genetically heterogeneous group of blood disorders characterized by the contradictory coexistence of immunodeficiency and autoimmunity (1).

This paradoxical phenotype can be associated with different mutations, the most frequent being IL7R-deficiency and the hypomorphic mutations in RAG genes, which severely impair but do not abolish the V(D)J recombination in lymphoid cells (2, 3). This profoundly affects T- and B-cells development, leading to the SCID phenotype. On the other hand, autoreactive T-cells, showing a highly restricted TCR usage with common specificity across patients, are present in the skin and intestine, where they trigger the typical autoimmune inflammation (4).

The characteristics of the residual OS T-cells prompted us to evaluate the contribution of embryonic lymphoid lineages to the disease. In fact, during embryonic development, the first lymphoid progenitors arise in the yolk sac (YS) before the emergence of hematopoietic stem cells (HSCs) and generate, in an IL7-independent manner (5), a subset of oligoclonal, self-responding and self-renewing lymphocytes that colonize the periphery (6, 7).

Based on their similarity to YS-derived T-cells, we speculated that the auto-reactive OS T-cells are generated in the YS independently from HSCs.

Our preliminary data in a RAG2R229Q OS mouse model (8) clearly show that the thymus of these mice is almost completely devoid of CD4+CD8+ (DP) cells, suggesting that OS HSCs cannot produce mature T-cells in vivo.

In vitro assays further demonstrated that adult OS HSPCs cannot give rise to T-cells, while YS-derived progenitors achieve to generate DP cells.

Moreover, we proved that fetal reprogramming of adult OS HSPCs by Lin28 ectopic expression is sufficient to partially rescue the DP T-cells potential, meaning that only embryonic lymphopoiesis is functional in presence of OS mutations.

To unequivocally identify the origin of OS autoreactive lymphocytes, we plan to generate a lineage-tracing system to label hematopoietic progenitors at different time of development and follow their T-cell progeny with a fluorescent reporter. With this tool, by looking at the presence of fluorescent autoreactive T-cells in peripheral tissues of OS adult mice, we will track back their developmental precursor, in an unquestionable manner.

In future, by using patients-derived iPSCs, we aim to translate this study in a human setting.

Taken together, our studies describe the previously unappreciated contribution of YS-derived progenitors to the pool of autoimmune T-cells in OS, underscoring the importance of determining the ontological source to identify new and more specific therapeutic targets.

#### STUDIO DELL'ORIGINE EMBRIONALE DEI LINFOCITI T AUTOREATTIVI NELLA SINDROME DI OMENN

La sindrome di Omenn è una patologia peculiare per la coesistenza nello stesso paziente di immunodeficienza e autoimmunità.

È causata da mutazioni in geni coinvolti nel processo di maturazione dei linfociti B e T che rendono i pazienti altamente suscettibili alle infezioni sin dai primi mesi di vita.

Diversamente dalle immunodeficienze classiche, la sindrome di Omenn è caratterizzata dalla residua presenza di pochi cloni linfocitari che si espandono e si attivano in periferia, causando danni ai tessuti e reazioni autoimmuni.

Se non trattati con trapianto di midollo, i bambini affetti non sopravvivono alle complicanze della malattia. In attesa di un donatore, essi sono sottoposti a profilassi antimicrobiche e nutrizione parenterale, ma nessuna terapia è applicata per contrastare le gravi reazioni autoimmuni, che rappresentano anche la prima causa di insuccesso dei trapianti.

Attualmente si crede che i linfociti responsabili dell'autoimmunità derivino da pochi cloni "favoriti", che per la loro maturazione richiedono una minore attività dei fattori mutati nella sindrome di Omenn.

Questa spiegazione può giustificare il perché questi linfociti siano oligoclonali, ma non perché siano auto-reattivi e periferici.

La nostra ipotesi è che le mutazioni Omenn abbiano un impatto diverso sulla maturazione di progenitori linfoidei di diversa origine.

La maggior parte dei linfociti del nostro corpo è prodotta dalle cellule staminali ematopoietiche (CSE) che risiedono nel midollo osseo.

Durante lo sviluppo embrionale, esiste un programma di linfopoiesi, indipendente dalle CSE, che genera linfociti oligoclonali e auto-reattivi che si localizzano nei tessuti periferici, dove si rigenerano fino all'età adulta.

Per le somiglianze tra i linfociti di origine embrionale e quelli residui della patologia, noi ipotizziamo che le uniche cellule B a T in grado di formarsi in presenza di mutazioni Omenn, siano quelli derivanti da precursori embrionali indipendenti dalle staminali ematopoietiche del midollo.

In un modello murino della malattia, abbiamo dimostrato che le CSE non sono in grado di produrre linfociti maturi sia in vivo che in vitro, mentre i precursori ematopoietici embrionali lo sono.

Inoltre, abbiamo provato che la riprogrammazione di cellule staminali adulte allo stadio di progenitori embrionali è sufficiente a ripristinare il potenziale linfoide di queste cellule, confermando che l'unico programma di linfopoiesi attivo nella malattia è quello embrionale.

Il fine ultimo di questo progetto è la realizzazione di un modello umano della sindrome di Omenn, ricapitolando i differenti programmi di linfopoiesi tramite l'utilizzo di cellule staminali pluripotenti indotte derivanti da pazienti.

Tale risorsa sarebbe di fondamentale importanza per lo studio approfondito dei meccanismi di patogenesi e per la realizzazione di terapie più specifiche per l'autoimmunità Omenn.

1. Villa, A., L.D. Notarangelo, and C.M. Roifman, Omenn syndrome: inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 122(6): p. 1082-6.
2. Notarangelo, L.D., et al., Human RAG mutations: biochemistry and clinical implications. *Nat Rev Immunol*, 2016. 16(4): p. 234-46.
3. Giliani, S., et al., Omenn syndrome in an infant with IL7RA gene mutation. *J Pediatr*, 2006. 148(2): p. 272-4.
4. Rieux-Laucat, F., et al., Highly restricted human T cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J Clin Invest*, 1998. 102(2): p. 312-21.
5. Carvalho, T.L., et al., Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J Exp Med*, 2001. 194(8): p. 1141-50.
6. Yoshimoto, M., et al., Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(4): p. 1468-73.
7. Gentek, R., et al., Epidermal gammadelta T cells originate from yolk sac hematopoiesis and clonally self-renew in the adult. *J Exp Med*, 2018. 215(12): p. 2994-3005.

8. Marrella, V., et al., A hypomorphic R229Q Rag2 mouse mutant recapitulates human Omenn syndrome. J Clin Invest, 2007. 117(5): p. 1260-9.

Sindrome di Omenn

Coordinator: Ditadi Andrea

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16C04

**Disease Name:**

Omenn Syndrome

**Keywords:**

Immunodeficiency, Autoimmunity, Embryonic lymphopoiesis



## Poster P.18.127

### EX VIVO EXPANSION OF GENETICALLY-ENGINEERED HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS FROM MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD

Zonari E.<sup>[1]</sup>, Naldini M.M.<sup>[1]</sup>, Galasso I.<sup>[1]</sup>, Barcella M.<sup>[1]</sup>, Volpin M.<sup>[1]</sup>, Casirati G.<sup>[2]</sup>, Desantis G.<sup>[1]</sup>, Beretta S.<sup>[1]</sup>, Merelli I.<sup>[3]</sup>, Ciceri F.<sup>[2]</sup>, Montini E.<sup>[1]</sup>, Gentner B.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>SR-TIGET ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Hematology&BMT Unit, Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>ITB-CNR ~ Milano ~ Italy

Hematopoietic stem and progenitor cell (HSC/HSPC) expansion remains an unmet goal for ex vivo gene therapy/editing. Using mobilized peripheral blood CD34+ HSPC from healthy donors and patients with genetic diseases, we combined a state-of-the-art transduction protocol with subsequent ex vivo HSPC expansion. We compared different culture conditions containing previously published or novel compounds in their capacity to expand HSPC. Adding the pyrimidoindole derivative UM171 to the culture resulted in a modest HSC expansion, as measured by the gold-standard assay, namely primary and secondary xenotransplantation. To allow for high-throughput/multiplexed screening of culture conditions, we aimed to set up predictive in vitro assays that help quantifying HSC in culture. We combined surface marker-based sorting with tracking of cell divisions to zoom on the expansion behavior of the more primitive cells. In line with the xenograft data, cells that maintain a primitive marker profile undergo few cell divisions, as opposed to the bulk progenitors, which divide more robustly. Using these advanced in vitro readouts, we tested several variations on culture conditions, which impacted on HSC expansion potential. At last, we established single cell RNA sequencing (scRNAseq) as an unbiased method to dissect transcriptional cell-to-cell heterogeneity in expansion cultures. HSC-enriched population (CD34+90+201+: 3% of total culture with >70% of SCID repopulating potential) revealed little lineage priming after 4 days of expansion culture, with cell cycle status, metabolic state and transcriptional activation as the main drivers of cellular heterogeneity. We developed a lentiviral vector to tag cells with a uniquely barcoded transcript allowing us to couple scRNAseq with clonal tracking. This platform sets a framework to dissect HSC expansion, maintenance and loss by differentiation as outcomes of ex vivo culture, enabling rational optimization of expansion conditions towards clinical application in gene therapy.

L'espansione delle cellule ematopoietiche staminali e progenitrici (CSE/CPE) è uno degli obiettivi di fondamentale importanza per la terapia genica. Utilizzando CSE CD34+ mobilizzate nel sangue periferico (mPB) di donatori sani e pazienti affetti da malattie genetiche, abbiamo applicato il protocollo di trasduzione più all'avanguardia, seguito da una procedura di espansione delle CSE ex vivo. Abbiamo quindi comparato diverse condizioni di coltura cellulare contenenti vari composti, sia già noti in letteratura per la loro capacità di espandere le CSE, che di recente scoperta. Abbiamo misurato l'espansione delle CSE mediante xenotrapianto primario e secondario, ad oggi considerato il metodo di riferimento per la quantifica delle cellule staminali. Tuttavia, per effettuare un'analisi multipla e dettagliata delle varie condizioni di coltura è stato necessario ideare delle procedure in vitro che fossero in grado di quantificare le CSE in coltura. Per sondare il comportamento delle CSE durante l'espansione, abbiamo effettuato un sorting delle cellule basato su specifici markers di superficie per poi monitorare i processi di divisione cellulare. Coerentemente con i dati ottenuti dagli xenotrapianti, le cellule con il più alto profilo di staminalità hanno un basso indice di divisione, mentre le cellule progenitrici si dividono con maggior frequenza. Sfruttando queste tecniche avanzate abbiamo testato

svariate condizioni di coltura cellulare, osservando il loro impatto sul potenziale d'espansione delle CSE. Infine, abbiamo sottoposto le cellule ad un sequenziamento di RNA a singola cellula (scRNAseq) per valutarne in modo specifico l'eterogeneità durante l'espansione. Infine, abbiamo sviluppato un vettore lentivirale in grado di marcare ogni cellula con uno specifico barcode per consentirci di identificare i singoli cloni e abbinare i dati provenienti dall' scRNAseq. Questo lavoro ha consentito di creare uno scenario sperimentale per analizzare le CSE in coltura, e testare come la loro staminalità possa essere mantenuta o persa durante l'espansione. Ciò ci sta permettendo di ottimizzare le condizioni di espansione delle CSE in vista di un'applicazione clinica futura nella cura delle malattie genetiche.

Zonari E, Desantis G, Petrillo C, Boccalatte FE, Lidonnici MR, Kajaste-Rudnitski A, Aiuti A, Ferrari G, Naldini L, Gentner B. Efficient Ex Vivo Engineering and Expansion of Highly Purified Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations for Gene Therapy. *Stem Cell Reports*. 2017 Apr 11;8(4):977-990.  
PMID: 28330619; PubMed Central PMCID: PMC5390102.

Tecnologia di Piattaforma

Coordinator: Bernhard Gentner

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16C01

**Disease Name:**

Platform Technology

**Keywords:**

Ex vivo gene therapy, Hematopoietic stem cells, Expansion

## Poster P.18.128

### GENE CORRECTION OF CD40LG GENE IN T CELLS AND HSPC FOR THE TREATMENT OF X-LINKED HYPER-IGM IMMUNODEFICIENCY

Vavassori V.<sup>[1]</sup>, Mercuri E.<sup>[1]</sup>, Schirotti G.<sup>[1]</sup>, Marcovecchio G.<sup>[1]</sup>, Castiello M.C.<sup>[1]</sup>, Annoni A.<sup>[1]</sup>, Albano L.<sup>[1]</sup>, Capo V.<sup>[1]</sup>, Margulies C.<sup>[2]</sup>, Buquicchio F.<sup>[2]</sup>, Cotta--Ramusino C.<sup>[2]</sup>, Villa A.\*<sup>[1]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Genovese P.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Editas Medicine ~ Boston ~ United States of America

X-linked hyper-IgM syndrome (HIGM1) is caused by mutations of CD40LG, whose absence in CD4 T-cells impairs their helper signaling for B-cell activation/immunoglobulin class-switching. Since its unregulated expression caused lymphoproliferation/lymphomas, we aimed to correct CD40LG while preserving its physiologic regulation. Corrected autologous T-cells could provide immediate therapeutic benefit to patients by resolving pre-existing infections and bridge them towards a definitive cure by Hematopoietic-Stem/Progenitor-Cell (HSPC) transplant. To validate this strategy, we infused wild-type T-cells into HIGM1 mice pre-conditioned or not with different lymphodepleting regimens, reaching long-term, stable T-cell engraftment and partial rescue of antigen-specific IgG response upon vaccination. Thus, we optimized a CRISPR/Cas9-based protocol to insert a corrective cDNA into the first intron of CD40LG in human T-cells and correct most disease-causing mutations with the same highly-specific reagents. This strategy allows ~40% T-cell correction while preserving the long-term-repopulating T-stem-memory cells. CD40L expression and physiologic regulation was restored on edited CD4+ T-cells from both healthy donors and HIGM1 patients, reaching up-to 60% of wild-type expression level. Corrected T-cells provided normal contact-dependent helper function to B-cell as assessed by in-vitro proliferation, class-switching and IgG secretion assays. To increase the yield of edited T-cell before transplant, we coupled the corrective cDNA with a clinical-compatible selector gene and confirmed that enriched T-cells preserved their engraftment capacity in NSG mice. Since surface expression of the reporter gene was observed also in resting cells, we exploited an optimized, truncated version of the EGFR selector gene for allowing in vivo tracking of the edited cells and, in case of adverse events, their depletion by a pharmaceutical-grade monoclonal antibody. Our work establishes the rationale and guiding principles for clinical translation of T cells gene correction for treating HIGM1 patients.

La sindrome da iper-IgM legata all'X (HIGM1) è causata da mutazioni di CD40LG, la cui assenza nelle cellule T CD4 compromette la loro capacità di attivazione delle cellule B e induzione del cambio di classe delle immunoglobuline. Poiché la sua espressione non regolata ha causato linfoproliferazione/linfomi in un modello murino, abbiamo mirato a correggere il CD40LG preservandone la regolazione fisiologica. Le cellule T autologhe corrette potrebbero fornire un beneficio terapeutico immediato ai pazienti risolvendo infezioni preesistenti e collegandole a una cura definitiva mediante trapianto di cellule staminali ematopoietiche / cellule progenitrici (HSPC). Per validare questa strategia, abbiamo infuso cellule T wild-type in topi HIGM1 preconditionati o meno con diversi regimi linfodepletanti, raggiungendo l'attecchimento stabile a lungo termine delle cellule T e il recupero parziale della risposta IgG specifica dell'antigene dopo la vaccinazione. Pertanto, abbiamo ottimizzato un protocollo basato su CRISPR/Cas9 per inserire un cDNA correttivo nel primo introne di CD40LG nelle cellule T umane e correggere la maggior parte delle mutazioni che causano malattie con un unico set di reagenti altamente specifici. Questa strategia consente di correggere circa

il 40% delle cellule T preservando le cellule di staminali della memoria T, capaci di ripopolamento a lungo termine. L'espressione di CD40L e la sua regolazione fisiologica sono state ripristinate su cellule T CD4 + editate da donatori sani e pazienti HIGM1, raggiungendo fino al 60% del livello di espressione fisiologico. Le cellule T corrette hanno fornito la normale funzione di supporto dipendente dal contatto alle cellule B, valutata mediante test di proliferazione in vitro, cambio di classe e secrezione di IgG. Per aumentare la resa delle cellule T modificate prima del trapianto, abbiamo accoppiato il cDNA correttivo con un gene selettore clinicamente compatibile e confermato che le cellule T arricchite conservavano la loro capacità di attecchimento nei topi NSG. Poiché l'espressione superficiale del gene reporter è stata osservata anche nelle cellule a riposo, abbiamo sfruttato una versione troncata ottimizzata del gene selettore EGFR per consentire il tracciamento in vivo delle cellule modificate e, in caso di eventi avversi, la loro deplezione da parte di un anticorpo monoclonale di livello farmaceutico. Il nostro lavoro stabilisce le motivazioni e i principi guida per la traduzione clinica della correzione genica delle cellule T per il trattamento di pazienti con HIGM1.

Genovese et al., Nature 2014

Schirotti et al., Science Translational Medicine 2017

Schirotti et al., Cell Stem Cell 2019

Sindrome da iper-IgM legata al cromosoma X

Coordinator: Pietro Genovese

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16E3

**Disease Name:**

X-linked Hyper IgM Syndrome

**Keywords:**

Gene Editing, CD40L, Immunodeficiency

## 19\_Genetic hepatic disease

## Poster P.19.129

### IDENTIFICATION AND THERAPEUTIC TARGETING OF NEW MOLECULAR PATHWAYS IN WILSON DISEASE

Catalano F.\*, Polishchuk E., Petruzzelli R., Concilli M., Crispino R., De Cegli R., Carissimo A., Polishchuk R.

*Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy*

Wilson disease (WD) is an inherited copper (Cu) toxicosis caused by impairment in the biliary Cu excretion. WD arises from mutations in the ATP7B gene encoding liver-specific ATPase, which effluxes Cu across the cellular membrane at the expense of ATP hydrolysis. ATP7B senses and eliminates excess Cu into the bile using tightly regulated exocytic process (Polishchuk et al., 2014). Loss of ATP7B function leads to toxic accumulation of Cu in hepatocytes and to their consequent death culminating in liver failure. Although being effective in many cases, the existing WD treatments have been documented to cause serious side effects and exhibited limited efficiency in a large cohort of patients. Thus, supplementary and/or alternative therapeutic approaches are desirable and require identification of new pathways and drugs that reduce Cu toxicity in ATP7B-deficient hepatic cells.

To achieve this objective, we utilized combination of genomics, systems biology, bioinformatics and high throughput screening (HCS) approaches. Using these tools autophagy was identified as a novel pro-survival mechanism that helps ATP7B-deficient hepatocytes to handle copper build up through sequestration of damaged and, hence, potentially toxic cell components. Activation of autophagy significantly increased the ability of ATP7B-deficient cells to resist Cu, while suppression of autophagy promoted Cu toxicity in both cell and animal models of Wilson disease (Polishchuk et al., 2019). Bioinformatics search for autophagy-activating FDA-approved drugs revealed a safe compound, which allowed ATP7B-deficient cells and animals to tolerate Cu overload, indicating a potential candidate drug for WD cure.

In parallel, we screened FDA-approved drug and genome-wide shRNA libraries to detect small molecules and shRNAs reducing toxicities of Cu in ATP7B-deficient cells. As a result, a dozen of drugs and shRNAs corresponding to more than 100 genes were detected to increase tolerance of the cells to Cu. Thus, these screening revealed new molecular targets and FDA-approved compounds for further validation and development of novel therapeutic strategies to combat Wilson disease.

#### IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MECCANISMI MOLECOLARI COME POTENZIALI TARGET TERAPEUTICI NELLA MALATTIA DI WILSON.

La malattia di Wilson (MW) è una tossicosi ereditaria di rame causata da difetto nell'escrezione biliare di rame. La MW nasce da mutazioni nel gene ATP7B che codifica l'ATPasi specifica del fegato, che trasporta rame attraverso la membrana cellulare utilizzando idrolisi ATP. ATP7B rileva ed elimina l'eccesso di rame nella bile utilizzando un processo esocitico strettamente regolato (Polishchuk et al., 2014). La perdita della funzione di ATP7B porta all'accumulo tossico di rame negli epatociti e alla loro conseguente morte che culmina nell'insufficienza epatica. Pur essendo efficace in molti casi, i trattamenti di MW esistenti causano gravi effetti collaterali e hanno esibito una limitata efficienza in una grande coorte di pazienti. Pertanto, gli approcci terapeutici supplementari e/o alternativi sono

auspicabili e richiedono l'identificazione di nuove vie e farmaci che riducano la tossicità di rame nelle cellule epatiche carenti di ATP7B.

Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo utilizzato una combinazione di genomica, bioinformatica e high content screening (HCS). Utilizzando questi strumenti l'autofagia è stato identificato come un nuovo meccanismo pro-sopravvivenza che aiuta gli epatociti carenti di ATP7B a gestire l'accumulo di rame attraverso il sequestro di componenti cellulari danneggiati e quindi potenzialmente tossici. L'attivazione dell'autofagia ha aumentato significativamente la capacità delle cellule carenti di ATP7B di resistere al rame, mentre la soppressione dell'autofagia ha promosso la tossicità del rame nei modelli cellulari e animali della malattia di Wilson (Polishchuk et al., 2019). La ricerca bioinformatica di farmaci approvati dalla FDA che attivano l'autofagia ha rivelato un composto, che ha permesso alle cellule e agli animali carenti di ATP7B di tollerare il sovraccarico di rame, indicando un potenziale farmaco candidato per la cura di MW.

Allo stesso tempo, abbiamo esaminato le librerie di shRNA (genome-wide) e di farmaci approvate dalla FDA per rilevare piccole molecole e shRNA che riducono la tossicità del rame nelle cellule carenti di ATP7B. Di conseguenza, una dozzina di farmaci e shRNA corrispondenti a più di 100 geni sono stati rilevati per aumentare la tolleranza delle cellule al rame. Pertanto, questi screening hanno rivelato nuovi target molecolari e composti approvati dalla FDA per un'ulteriore convalida e sviluppo di nuove strategie terapeutiche per combattere la malattia di Wilson.

Polishchuk EV, Concilli M, Iacobacci S, Chesi G, Pastore N, Piccolo P, Paladino S, Baldantoni D, Chan J, Chang CJ, Amoresano A, Pane F, Pucci P, Tarallo A, Parenti G, Brunetti-Pierrri N, Settembre C, Ballabio A, Polishchuk RS. (2014) Wilson disease protein ATP7B utilizes lysosomal exocytosis to maintain copper homeostasis. *Dev Cell*. 29: 686-700.

Polishchuk EV, Merolla A, Lichtmanegger J, Romano A, Indrieri A, Ilyechova EY, Concilli M, Del Cegli R, Crispino R, Mariniello M, Petruzzelli R, Ranucci G, Iorio R, Pietrocola F, Einer C, Borchard S, Zibert A, Schmidt H, Di Schiavi E, Puchkova LV, Franco B, Kroemer G, Zischka H, Polishchuk RS. (2019) Activation of autophagy, observed in liver tissues from patients with Wilson disease and from Atp7b-deficient animals, protects hepatocytes from copper-induced apoptosis. *Gastroenterology*, 156: 1173-1189.

Malattia di Wilson

Coordinator: Roman Polishchuk

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Wilson Disease

**Keywords:**

Wilson disease, ATP7B, Copper homeostasis



## 20\_Genetic immune disease

## Poster P.20.130

### MODULATION OF LINE-1 RETROTRANSPOSITION BY AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME-RELATED GENES.

Menetti V.\*, Muzi Falconi M.

*Università degli studi di Milano, Dipartimento di Bioscienze ~ Milano ~ Italy*

Aicardi-Goutières syndrome (AGS) is a rare genetically heterogeneous disease that typically affects newborns and infants and AGS patients are characterized by cerebral atrophy, intracranial calcifications and elevated levels of IFN $\alpha$  in the cerebrospinal fluid (CSF). AGS is caused by mutations in several genes encoding nucleic acids metabolizing enzymes: the 3' exonuclease 1 (TREX1), any of the three subunits (RNASEH2A, RNASEH2B, and RNASEH2C) of the ribonuclease H2 (RNase H2) enzyme complex, the triphosphohydrolase encoded by SAMHD1, the adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1), or the RNA sensor melanoma differentiation associated protein 5 (MDA5). Strong evidence suggest that nucleic acids are responsible for triggering sensors of the immunity, so it is generally believed that an accumulation of unprocessed, endogenous nucleic acids constitutes the main pathogenic trigger of AGS, increased CSF IFN $\alpha$  levels. Among all the AGS-causing genes, TREX1, ADAR1 and SAMHD1 could affect the correct metabolism of LINE1 retroelements, DNA sequences able to move in the genome through an RNA intermediate. The nucleic acids species accumulated in cytoplasm as a consequence of mutation in AGS-causing genes are yet to be defined and one of the major candidates can be retrotransposition intermediates. These findings provide a possible link between the dysregulation of retroelements and the pathogenesis of AGS. The molecular mechanisms linking AGS-causing genes with the hyper-activation of the innate immunity have not been elucidated yet and characterize a possible involvement of retroelements metabolism in the AGS pathogenesis is the long term goal of this project.

Regolazione della retrotrasposizione di LINE1 da parte dei geni responsabili della sindrome di Aicardi-Goutières.

La sindrome di Aicardi-Goutières (AGS) è una malattia infantile genetica rara, i pazienti AGS sono caratterizzati da: atrofia cerebrale, calcificazioni intracraniche ed elevati livelli di interferone-alfa nel liquido cerebro-spinale. AGS è causata da mutazioni in alcuni geni che codificano per enzimi che metabolizzano gli acidi nucleici: TREX1, ognuna delle tre subunità (RNASEH2A, RNASEH2B, and RNASEH2C) del complesso enzimatico RNase H2, SAMHD1, ADAR1 ed MDA5. Molteplici evidenze sperimentali suggeriscono che gli acidi nucleici siano responsabili dell'attivazione di sensori dell'immunità innata, pertanto è generalmente accettata l'ipotesi che vede l'accumulo di acidi nucleici endogeni non processati come principale causa della patologia, gli elevati livelli di IFN $\alpha$  nel liquido cerebro-spinale. Tra tutti i geni responsabili della sindrome di Aicardi-Goutières, TREX1, ADAR1 e SAMHD1 possono regolare il metabolismo dei retroelementi LINE1, sequenze di DNA che possono muoversi nel genoma tramite un intermedio a RNA. Le tipologie di acidi nucleici accumulati nel citoplasma a causa delle mutazioni responsabili dell'AGS sono ancora da identificare e gli intermedi di retroelementi sono tra i candidati più probabili. Sono ancora da caratterizzare i meccanismi molecolari che legano le mutazioni dei geni che causano questa sindrome con l'iperattivazione dell'immunità innata. Caratterizzare un possibile coinvolgimento del metabolismo dei retroelementi nella sindrome di Aicardi-Goutières è l'obiettivo a lungo termine di questo progetto.

- Aicardi J., and Goutières F. (1984). A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann. Neurol.* 15, 49-54.
- Aicardi J., and Goutières F. (2000). Systemic lupus erythematosus or Aicardi-Goutières syndrome? *Neuropediatrics* 31, 113.
- Akwa Y., Hassett D.E., Eloranta M.L., Sandberg K., Masliah E., Powell H., Whitton J.L., Bloom F.E., and Campbell I.L. (1998). Transgenic expression of IFN-alpha in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. *J. Immunol.* 161, 5016-5026.
- Ayyagari R., Gomes X.V., Gordenin D.A., and Burgers P.M.J. (2003). Okazaki fragment maturation in yeast. I. Distribution of functions between FEN1 AND DNA2. *J. Biol. Chem.* 278, 1618-1625.
- Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoriantseva L., Giulotto E., and Lingner J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318, 798-801.
- Beck C.R., Garcia-Perez J.L., Badge R.M., Moran J.V. (2011). LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. *Ann. Rev. Genom. Hum. G.* 12, 187–215.
- Maria Benitez-Guijarro, Cesar Lopez-Ruiz, Zygimante Tarnauskaite, Olga Murina, Mahwish Mian Mohammad, Thomas C. Williams, Adeline Fluteau, Laura Sanchez, Raquel Vilar-Astasio, Marta Garcia-Canadas, David Cano, Marie-Jeanne HC Kempen, Antonio Sanchez-Pozo, Sara R. Heras, Andrew P. Jackson, Martin A.M. Reijns & Jose L. Garcia-Perez. (2018). RNase H2, mutated in Aicardi-Goutières syndrome, promotes LINE-1 retrotransposition. *The EMBO Journal* e98506 1-22.
- Bertrand E., Chartrand P., Schaefer M., Shenoy S.M., Singer R.H. and Long, R.M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell.* 2, 437–445.
- Blasius A.L., and Bruce B. (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 32, 305-315.
- Jongsu Choi, Sung-Yeon Hwang and Kwangseog Ahn. (2017). Interplay between RNASEH2 and MOV10 controls LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Research.* 1-15.
- Coffin S.R, Hollis T., and Perrino F.W. (2011). Functional Consequences of the RNase H2A Subunit Mutations That Cause Aicardi-Goutières Syndrome. *J. Biol. Chem.* 286, 16984- 16991.
- Dewannieux M., Esnault C., Heidmann T. (2003). LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet.* 35, 41–48.
- Dombroski B.A., Mathias S.L., Nanthakumar E., Scott A.F. and Kazazian H.H. Jr. (1991). Isolation of an active human transposable element. *Science* 254, 1805–1808.

- Doucet A. J., Hulme A.E., Sahinovic E., Kulpa D.A, Moldovan J.B, Kopera H.C., Athanikar J.N., Hasnaoui M., Bucheton A., Moran J.V. and Gilbert N. (2010). Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS Genet.* 6, e1001150.
- Flavie Coquel, Maria-Joao Silva, Hervé Técher, Karina Zadorozhny, Sushma Sharma, Jadwiga Nieminuszczy, Clément Mettling, Elodie Dardillac, Antoine Barthe, Anne-Lyne Schmitz, Alexy Promonet, Alexandra Cribier, Amélie Sarrazin, Wojciech Niedzwiedz, Bernard Lopez, Vincenzo Costanzo, Lumir Krejci, Andrei Chabes, Monsef Benkirane, Yea-Lih Lin & Philippe Pasero. (2018). SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* 557, 57–61.
- Goodier J.L., Prabhat K. Mandal P.K., Zhang L., and Kazazian H.H Jr. (2010). Discrete subcellular partitioning of human retrotransposon RNAs despite a common mechanism of genome insertion. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1712–1725.
- Matthias Hamdorf, Adam Idica, Dimitrios G. Zisoulis, Lindsay Gamelin, Charles Martin, Katie J. Sanders & Irene M. Pedersen. (2015). Nature structural & molecular biology 22, 824-833.
- Hancks D.C., and Kazazian, H.H. (2012). Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 191-203.
- Lazzaro F., Novarina D., Amara F., Watt D.L., Stone J.E., Costanzo V., Burgers P.M., Kunkel T.A., Plevani P., and Muzi-Falconi M. (2012). RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA. *Mol. Cell.* 45, 99-110.
- Lin Y., Dent S.Y.R., Wilson J.H., Wells R.D., and Napierala M. (2010). R loops stimulate genetic instability of CTG{middle dot}CAG repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 692-697.
- Marshak-Rothstein A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 823-835.
- Moran J.V., Holmes S.E., Naas T.P., DeBerardinis R.J., Boeke J.D., Kazazian H.H. Jr. (1996). High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell.* 87, 917-927.
- Orecchini E., Doria M., Antonioni A., Galardi S., Ciafrè A.S., Frassinelli L., Mancone C., Montaldo C., Tripodi M., and Michienzi A. (2017). ADAR1 restricts LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 45, 155-168.
- Pizzi S., Sertic S., Orcesi S., Cereda C., Bianchi M., Jackson A.P., Lazzaro F., Plevani P., and Muzi-Falconi M. (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Human Molecular Genetics.* 24, 649–658.
- Querido E. and Chartrand P. (2008) Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. *Meth. Cell. Biol.* 85, 273-392.
- Reijns M.A.M., Rabe B., Rigby R.E., Mill P., Astell K.R., Lettice L.A., Boyle S., Leitch A., Keighren M., and Kilanowski F. (2012). Enzymatic Removal of Ribonucleotides from DNA Is Essential

for Mammalian Genome Integrity and Development. *Cell* 149, 1008-1022.

Reijns M.A.M., Jackson A.P. (2014). Ribonuclease H2 in health and disease. *Biochemical Society Transactions*. 42, 717-725.

Rigby R.E., Leitch A., and Jackson A.P. (2008). Nucleic acid-mediated inflammatory diseases. *Bioessays* 30, 833-842.

Sordet O., Nakamura A.J., Redon C.E., and Pommier Y. (2010). DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle* 9, 274-278.

Stetson D.B., Ko J.S., Heidmann T., and Medzhitov R. (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587-598.

Volkman H.E., and Stetson D.B. (2014). The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 15, 415-422.

Xie Y., Rosser J.M., Thompson T.L., Boeke J.D., and An W. (2011). Characterization of L1 retrotransposition with high-throughput dual-luciferase assays. *Nucleic Acids Res.* 39, e16.

Zhao K., Du J., Han X., Goodier J.L., Li P., Zhou X., Wei W., Evans S.L., Li L., and Zhang W. (2013). Modulation of LINE-1 and Alu/SVA retrotransposition by Aicardi-Goutières syndrome-related SAMHD1. *Cell Reports* 4, 1108-1115.

Sindrome di Aicardi-Goutières

Coordinator: Marco Muzi Falconi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15227

**Disease Name:**

Aicardi-Goutières Syndrome

**Keywords:**

LINE1, innate immunity, AGS-causing genes

## Poster P.20.131

### GENE THERAPY AND PATHOGENESIS OF CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE

Jofra Hernández R.\*, Migliavacca M., Scala S., De Mattia F., Basso--Ricci L., Calabria A., Benedicenti F., Farinelli G., Ilaria Visigalli I., Carriglio N., De Simone M., Vezzoli M., Cecere F., Norata R., Mauro V., Sanvito F., Cristofori P., Albertini P., Mortellaro A., Montini E., Gentner B., Naldini L., Aiuti A.

*San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ Milan ~ Italy*

Chronic granulomatous disease (CGD) is a rare inherited phagocyte disorder characterized by the inability to produce reactive oxygen species due to the absence of NADPH oxidase activity<sup>1,2</sup>. The objectives of this project is developing an effective gene therapy (GT) approach for CGD patients and better understanding disease pathogenesis. SR-Tiget developed the MSP.gp91\_126T(2) lentiviral vector (LV) targeting the expression of gp91phox to granulocytes/monocytes by a combination of transcriptional and micro-RNA-mediated regulation<sup>3,4</sup>. To assess the toxic and tumorigenic potential of transduced lineage-depleted (Lin-) hematopoietic stem-progenitor cells (HSPCs), we conducted a GLP study in Cybb-KO mice, a mouse model of XCGD. Cybb-KO Lin- cells were transduced or mock-transduced, and transplanted into lethally irradiated Cybb-KO mice. GT improved mice survival and blood leukocytes counts. Granulocytes and monocytes showed normal gp91phox expression and NADPH activity. After 12 months, pathological findings characterizing the XCGD model, such as granuloma, systemic inflammation, were reduced in GT mice. A diffuse lymphoblastic lymphoma caused the death of one out of 20 mice of the UT and GT groups. One GT mouse developed myeloid leukemia, while malignant sarcoma was observed in one mock mouse. These histopathological findings were considered within the background occurrence of mice exposed to irradiation. A genome-wide integration site (IS) analysis revealed that the IS number and population diversity of BM cells were on average similar to those observed in mouse preclinical studies. However, four GT mice showed a more oligoclonal IS distribution, so additional experiments, are ongoing to establish the safety of the GT approach.

We next investigated whether prolonged inflammation could alter the HSPC fitness by performing deep immunophenotyping of BM patients' CD34+HSPCs<sup>5,6</sup>. The proportion of hematopoietic stem cells (HSC) and multipotent progenitors (MPP) was lower in the BM of pediatric XCGD patients compared to age-matched healthy donors, while the percentage of HSC and MPP of adult XCGD patients was comparable to healthy adult controls. Lymphoid early T-cell progenitors and Pre B/NK cells were present in the BM of pediatric XCGD patients and healthy donors, but not in adult XCGD patients. Moreover, we designed a new HSC mobilization strategy for XCGD patients combining G-CSF/Plerixafor with Ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug. The procedure was well-tolerated with no occurrence of adverse events. The peak number of CD34+ cells in PB of the two patients enrolled was 170 and 63 cells/ $\mu$ l, with a total yield of 1.19 and 0.51  $\times 10^9$ , respectively. Collectively, we found that long-term exposure of patients' HSPCs to an inflammatory environment impacts negatively on their maintenance and differentiation, and thus, new mobilization strategies aimed at reducing inflammation are particularly valuable in patients with CGD.

Terapia genica e patogenesi della malattia granulomatosa cronica.

La malattia granulomatosa cronica (CGD) è un disturbo ereditario caratterizzato dall'incapacità dei fagociti di produrre specie reattive dell'ossigeno causata dall'assenza d'attività della NADPHossidasi<sup>1,2</sup>. Gli obiettivi di questo progetto sono lo sviluppo di un approccio di terapia genica

per i pazienti con CGD e migliorare la comprensione della patologia. SR-Tiget ha sviluppato il vettore lentivirale MSP.gp91\_126T (2) (LV) che indirizza l'espressione di gp91phox nei granulociti e monociti<sup>3,4</sup>. Per valutare la tossicità e tumorigenicità delle cellule staminali progenitrici ematopoietiche (HSPCs) trasdotte, abbiamo condotto uno studio GLP nel modello murino CGD. Le cellule del midollo osseo (BM) dei topi CGD sono state trasdotte/non trasdotte (mock) e trapiantate in topi CGD condizionati. La GT ha migliorato la sopravvivenza e normalizzato il numero dei leucociti nel sangue (PB). Granulociti e monociti hanno mostrato una normale espressione di gp91phox e attività di NADPH. Dopo 12 mesi, le caratteristiche patologiche del modello CGD (granuloma, infiammazione sistemica) sono marcatamente ridotti nei topi GT. Nei 20 topi/gruppo, 1 linfoma linfoblastico nei UT e GT, 1 leucemia mieloide nei GT e 1 sarcoma maligno nei mock è stata la causa di morte; dati compatibili con quanto riportato in topi irradiati letalmente. Un'analisi d'integrazione genomica (IS) del LV ha rivelato che il numero di IS e la diversità di popolazione delle cellule BM erano in media simili a quelli osservati negli studi preclinici nel topo. Tuttavia, quattro topi GT hanno mostrato una distribuzione IS più oligoclonale, e quindi sono in corso ulteriori esperimenti per stabilire la sicurezza dell'approccio GT.

Abbiamo poi esaminato se l'infiammazione prolungata possa alterare le HSPCs eseguendo un'immunofenotipo completo delle cellule CD34+ HSPCs dei pazienti<sup>5,6</sup>. La proporzione di cellule staminali ematopoietiche (HSC) e progenitori multipotenti (MPP) era inferiore nel BM dei pazienti XCGD pediatrici rispetto ai donatori sani, mentre la percentuale di HSC e MPP dei pazienti adulti e controlli sani era paragonabile. I progenitori linfoidi precoci delle cellule T e le cellule Pre-B/NK erano presenti nel BM di pazienti pediatrici e donatori sani, ma non in pazienti adulti. Inoltre, abbiamo elaborato una nuova strategia di mobilitazione delle cellule HSC combinando G-CSF/Plerixafor con Ibuprofen, un farmaco antinfiammatorio non steroideo. La procedura è ben tollerata senza eventi avversi. Il numero massimo di cellule CD34+ nel PB dei due pazienti era di 170 e 63 cellule/ $\mu$ l, con una resa totale rispettivamente di 1,19 e 0,51  $\times 10^9$ . Riassumendo, abbiamo identificato che l'esposizione degli HSPC dei pazienti a un ambiente infiammatorio ha un impatto negativo sul loro mantenimento e differenziamento, quindi, nuove strategie di mobilitazione volte a ridurre l'infiammazione sono particolarmente preziose nei pazienti con CGD.

1. Rider NL, Jameson MB, Creech CB. Chronic Granulomatous Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Genetic Basis of Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018. 7(suppl\_1): p.S2-S5.
2. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther.* 2017 Dec;34(12):2543-2557.
3. Chiriaco M, Farinelli G, Capo V, Zonari E, Scaramuzza S, Di Matteo G, Sergi LS, Migliavacca M, Hernandez RJ, Bombelli F, Giorda E, Kajaste-Rudnitski A, Trono D, Grez M, Rossi P, Finocchi A, Naldini L, Gentner B, Aiuti A. Dual-regulated lentiviral vector for gene therapy of X-linked chronic granulomatosis. *Mol Ther.* 2014. 22(8): p. 1472-1483.
4. Farinelli G, Jofra Hernandez R, Rossi A, Ranucci S, Sanvito F, Migliavacca M, Brombin C, Pramov A, Di Serio C, Bovolenta C, Gentner B, Bragonzi A, Aiuti A. Lentiviral Vector Gene Therapy Protects XCGD Mice From Acute Staphylococcus aureus Pneumonia and Inflammatory Response. *Mol Ther.* 2016 Oct;24(10):1873-1880.
5. Ludin A, Gur-Cohen S, Golan K, Kaufmann KB, Itkin T, Medaglia C, Lu XJ, Ledergor G, Kollet O, Lapidot T. Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Oct 10;21(11):1605-19.
6. Weisser M, Demel UM, Stein S, Chen-Wichmann L, Touzot F, Santilli G, Sujer S, Brendel C, Siler

U, Cavazzana M, Thrasher AJ, Reichenbach J, Essers MAG, Schwäble J, Grez M. Hyperinflammation in patients with chronic granulomatous disease leads to impairment of hematopoietic stem cell functions. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jul;138(1):219-228.e9.

7. Yannaki E, Karponi G, Zervou F, Constantinou V, Bouinta A, Tachynopoulou V, Kotta K, Jonlin E, Papayannopoulou T, Anagnostopoulos A, Stamatoyannopoulos G. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with  $\beta$ -thalassemia major. *Hum Gene Ther.* 2013 Oct;24(10):852-60.

Malattia Granulomatosa cronica

Coordinator: Alessandro Aiuti

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

SR-TIGET PROJECT GENE THERAPY

**Disease Name:**

Chronic Granulomatous Disease

**Keywords:**

Chronic granulomatous disease, gene therapy, hematopoietic stem cell mobilization



## Poster P.20.132

### SCREENING CVID PATIENTS WITH T CELL DEFECTS FOR PATHOGENIC VARIANTS OF CILIARY PROTEINS IDENTIFIES CCDC28 AS NEW PLAYER IN IMMUNE SYNAPSE ASSEMBLY

Onnis A.<sup>[1]</sup>, Capitani N.<sup>[1]</sup>, Cassioli C.<sup>[1]</sup>, Finetti F.<sup>[1]</sup>, Lougaris V.<sup>[2]</sup>, D'Elia M.M.<sup>[3]</sup>, Plebani A.<sup>[2]</sup>, Baldari C.T.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Siena ~ Siena ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Brescia ~ Brescia ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Florence ~ Florence ~ Italy

Common variable immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency the hallmark of which is hypogammaglobulinemia. While intrinsic B cell defects account for the impaired antibody production in a significant proportion of patients, defects in other cellular components implicated in this process, namely T cells and antigen presenting cells (APC), have also been reported. Accordingly, multiple disease-associated genes have been identified, indicating that CVID groups multiple genetic disorders unified by antibody deficiency. For approximately 40% of these the aetiology is as yet unknown.

Our lab has previously reported that in CVID patients with defective T cell function (T-CVID) signaling by the T cell antigen receptor (TCR) is impaired, which in some patients was associated with deficiency of the actin regulator Vav. Here we extended our search for the genetic lesion(s) in T-CVID focusing on the immune synapse (IS), a specialized signaling platform that T cells assemble at the contact with cognate APCs. Based on our discovery that proteins implicated in ciliogenesis are co-opted by the non-ciliated T cell for IS assembly, we looked at ciliary proteins as candidate disease genes. Exome sequencing on 7 T-CVID patients revealed potentially deleterious SNPs among the ~100 genes analyzed. RT-PCR analysis of these genes in a cohort of over 100 CVID patients showed that the frequency of one of these SNPs, mapping to the CCDC28B coding sequence, was increased in CVID.

CCDC28B is a coiled-coil domain protein that acts as disease modifier in Bardet-Biedl syndrome and participates in ciliogenesis, however the underlying mechanism is largely unknown. We found that CCDC28B is expressed in T cells, where it co-localizes with early and recycling endosomes at the centrosome, with which it polarizes towards the APC during IS assembly. CCDC28B silencing in T cells resulted in impaired TCR accumulation at the IS, concomitant with defective phosphotyrosine signaling. The fact that the centrosome translocated normally in CCDC28B-deficient T cells suggested a defect in polarized TCR recycling, a process essential for replenishing the synaptic membrane with TCRs associated with an endosomal pool to sustain signaling. TCR recycling was indeed impaired in the absence of CCDC28B as a result of the inability of these cells to polymerize actin filaments on endosomes. This was caused by the failure of the actin regulator WASH to be recruited to endosomes carrying recycling TCRs. Biochemical analyses showed that CCDC28B interacts with WASH and the retromer complex to promote recycling. Collectively, our data identify CCDC28B as a new player in IS assembly that contributes to polarized TCR recycling by recruiting WASH to endosomal TCR for local actin polymerization. We have now cloned the CVID-associated CCDC28B variant and are testing the outcome of its expression on IS assembly in T cells. The results highlight a new strong candidate disease gene in T-CVID.

Lo screening di pazienti CVID per varianti patogeniche di proteine ciliari identifica CCDC28B quale coordinatore dell'assemblaggio della sinapsi immunologica

L'immunodeficienza comune variabile (CVID) è la più frequente malattia genetica del sistema immunitario. Questa patologia è caratterizzata da una grave riduzione dei livelli di anticorpi, che si manifesta in aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche e tendenza a sviluppare con alta frequenza danni polmonari irreversibili, patologie granulomatose e gastrointestinali, autoimmunità e cancro. L'attuale trattamento prevede la somministrazione a vita di anticorpi, il che comporta non solo un impatto negativo sulla qualità di vita dei pazienti ma spesso sfocia in gravi complicanze di tipo anafilattico. Mentre il difetto nella produzione di anticorpi è condiviso da tutti i pazienti CVID, non esiste una correlazione tra i livelli anticorpali e le specifiche complicanze. In accordo con questa eterogeneità, recenti progressi suggeriscono che la CVID è in realtà un insieme di differenti malattie genetiche. L'identificazione delle lesioni genetiche nella CVID potrà migliorare la precisione della diagnosi, contribuendo alla scelta del trattamento più adatto tra le terapie esistenti e fornendo nuovi spunti per lo sviluppo di terapie personalizzate. Con questo progetto vogliamo contribuire a questo obiettivo caratterizzando il macchinario molecolare che controlla l'attivazione dei linfociti T, un processo difettivo in circa il 40% dei pazienti CVID e associato alle presentazioni più gravi della malattia.

L'attivazione dei linfociti T dipende dalla formazione della sinapsi immunologica, una piattaforma molecolare attraverso la quale il linfocita riceve istruzioni da parte di altre cellule del sistema immunitario. Abbiamo recentemente dimostrato l'inatteso coinvolgimento in questo processo di proteine che controllano la formazione del ciglio primario, un organello di cui i linfociti T sono privi. Questa scoperta ha aperto un nuovo scenario, rivelando un'omologia tra la sinapsi immunologica e il ciglio primario che stiamo sfruttando per la ricerca delle lesioni genetiche nei pazienti CVID con difetti a carico dei linfociti T. Lo screening di oltre 100 pazienti ha rivelato mutazioni puntiformi potenzialmente patogeniche nei geni codificanti per alcune proteine ciliari. I nostri studi si sono focalizzati su una di queste, CCDC28B, di cui la variante patogenetica presenta una frequenza più elevata nei pazienti CVID. Abbiamo dimostrato che CCDC28B è essenziale per l'assemblaggio della sinapsi immunologica, verso la quale controlla il trasporto del recettore dell'antigene da cui parte il segnale per avviare la formazione della sinapsi immunologica e l'attivazione del linfocita T. Stiamo attualmente valutando il significato patogenetico della variante identificata nei pazienti CVID.

1. Cunningham-Rundles C. 2010. How I treat Common Variable Immunodeficiency. *Blood* 116:7-15.
2. Boncristiano M, Majolini MB, D'Elios MM, Pacini S, Valensin S, Ulivieri C, Amedei A, Falini B, Del Prete G, Telford JL, Baldari CT. 2000. Defective recruitment and activation of ZAP-70 in common variable immunodeficiency patients with T cell defects. *Eur J Immunol* 30:2632-2638.
3. Paccani SR, Boncristiano M, Patrussi L, Ulivieri C, Wack A, Valensin S, Hirst TR, Amedei A, Del Prete G, Telford JL, D'Elios MM, Baldari CT. 2005. Defective Vav expression and impaired F-actin reorganization in a subset of patients with common variable immunodeficiency characterized by T-cell defects. *Blood* 106:626-634.
4. Dustin ML, Choudhuri K. 2016. Signaling and Polarized Communication Across the T Cell Immunological Synapse. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32:303-325.

5. Cassioli C, Baldari CT. 2019. A ciliary view of the immunological synapse. *Cells* 8, 789; doi:10.3390/cells8080789

Immunodeficienza Comune Variabile

Coordinator: Cosima T Baldari

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16003

**Disease Name:**

CVID (Common Variable Immunodeficiency)

**Keywords:**

immune synapse, TCR signaling, vesicular trafficking

## Poster P.20.133

### MECHANISMS OF ENHANCED HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSDUCTION AND NUCLEIC ACID SENSING

Petrillo C.<sup>[1]</sup>, Piras F.<sup>[1]</sup>, Unali G.<sup>[1]</sup>, Cittaro D.<sup>[2]</sup>, Calabria A.<sup>[1]</sup>, Castiglioni I.<sup>[1]</sup>, Cuccovillo I.<sup>[1]</sup>, Matafora V.<sup>[3]</sup>, Bachi A.<sup>[3]</sup>, Montini E.<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>, Gentner B.<sup>[1]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Kajaste--Rudnitski A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>SR-TIGET ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Center for Translational Genomics and Bioinformatics ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation (IFOM) ~ Milano ~ Italy

Current hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) gene therapy protocols require the use of multiple hits at high vector doses and prolonged ex vivo culture to reach clinically relevant transduction levels, imposing large-scale vector production and potentially compromising HSPC preservation in culture. Therefore, improving LV transduction efficiency in HSPC remains a high priority goal for the field. With this general objective in mind, this Research Project proposal builds on our previous observations that lentiviral transduction efficiency can be significantly increased in presence of compounds such as Cyclosporin A (CsA) or Rapamycin through distinct mechanisms (Petrillo et al., Mol Ther. 2015) as well as molecular insight we have gained regarding the signaling cascades activated upon transduction in human HSPC. These findings set the grounds for the characterization of the molecular mechanisms of LV restriction in HSPC and open the door for investigating the impact LV transduction and, more broadly, nucleic acid sensing have in different disease settings (Kajaste-Rudnitski and Naldini, Hum Gene Ther. 2015).

Up to date, our studies on vector-host interactions have uncovered substantial differences in how HSPC sense distinct viral vectors (Piras et al., EMBO Mol Med 2017) and identified the antiviral protein IFITM3 as a potent innate immune block to gene transfer constitutively active in HSPC, leading to the development of novel, highly efficient gene therapy approaches based on the use of cyclosporine H (Petrillo et al., Cell Stem Cell 2018). We have also recently shown that cyclosporine A may also preserve HSPC during ex vivo manipulation (Petrillo et al., Human Gene Ther 2019). We are currently investigating LV-mediated signaling and nucleic acid sensing in inflammatory disease backgrounds for more stealth gene transfer and work on identifying the molecular partners involved in IFITM3 restriction of lentiviral transduction in HSPC and the capacity of cyclosporines to overcome it. Overall, our efforts to understand the crosstalk between HSPC and viral vectors instructs us on which immune sensors and effectors to avoid and how, providing means to maximize gene engineering efficiencies and curb donor variability while preserving HSPC biological properties.

### MECCANISMI DI EFFICIENTE TRASDUZIONE E DI RICONOSCIMENTO DEGLI ACIDI NUCLEICI NELLE CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Ad oggi, per essere efficace, il protocollo clinico di terapia genica su cellule staminali ematopoietiche (CSE) richiede l'uso in combinazione di esposizioni ripetute e alte dosi di vettore unite ad una potente stimolazione cellulare. Questi due fattori impattano negativamente sull'efficienza della procedura poiché, da una parte, impongono il bisogno di una grande quantità di vettore, mentre dall'altra la prolungata cultura ex vivo può interferire con le delicate funzioni biologiche delle CSE. Migliorare l'efficienza di trasduzione delle CSE da parte dei vettori lentivirali resta quindi un obiettivo primario nel campo della terapia genica, poiché questo consentirebbe di abbassare i costi della procedura,

altrimenti insostenibili, e diminuire il possibile impatto della terapia sulla fisiologia della cellula. Per raggiungere questo obiettivo, ci baseremo sui nostri precedenti studi in cui abbiamo mostrato sia che composti quali ciclosporina A (CsA) e Rapamicina sono in grado di aumentare notevolmente la trasduzione lentivirale (Petrillo et al, Mol Ther. 2015) sia quali sono le vie molecolari attivate dalla trasduzione virale in CSE umane. Il nostro lavoro ha permesso di gettare le fondamenta per la caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base della resistenza delle CSE alla trasduzione lentivirale, e ha dato inizio agli studi sull'impatto della trasduzione lentivirale e più in generale l'impatto che il riconoscimento degli acidi nucleici ha in diversi contesti patologici (Kajaste-Rudnitski and Naldini, Hum Gene Ther. 2015).

In questo contesto, abbiamo osservato che le CSE reagiscono in modo molto differente a diversi tipi di vettori di terapia genica (Piras et al., EMBO Mol Med 2017) e stiamo valutando l'impatto della trasduzione nel contesto di CSE da pazienti con patologie infiammatorie. Inoltre, siamo riusciti ad individuare la proteina antivirale IFITM3 come responsabile di un potente blocco all'ingresso dei vettori lentivirali nelle CSE e scoperto che questo blocco può essere superato in modo molto efficiente dalla ciclosporina H (Petrillo et al., Cell Stem Cell 2018). I nostri studi più recenti suggeriscono anche che, oltre ad aumentare l'efficienza del trasferimento genico, le ciclosporine possano avere un'azione benefica nel preservare le CSE durante la fase di manipolazione ex vivo (Petrillo et al., Human Gene Ther 2019). Sono in corso studi per identificare i partner molecolari coinvolti negli effetti di IFITM3 e delle ciclosporine nelle CSE. Nel complesso, i nostri studi sulle interazioni tra CSE e vettori di terapia genica ci permetteranno di sviluppare strategie di terapia genica più efficaci e sicuri per il trattamento di numerose malattie.

Petrillo C, Cesana D, Piras F, Bartolaccini S, Naldini L, Montini E, Kajaste-Rudnitski A. Cyclosporin A and Rapamycin relieve distinct lentiviral restriction blocks in hematopoietic stem and progenitor cells. Mol Ther., Feb. 23. 2015.

Kajaste-Rudnitski A. and Naldini L., Cellular innate immunity and restriction of viral infection - implications for lentiviral gene therapy in human hematopoietic cells. Hum Gene Ther. Apr;26(4):201-9. 2015.

Piras F, Riba M, Petrillo C, Lazarevic D, Cuccovillo I, Bartolaccini S, Stupka E, Gentner B, Cittaro D, Naldini L, Kajaste-Rudnitski A. Lentiviral Vectors Escape Innate Sensing but Trigger p53 In Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. EMBO Mol Med. Sep;9(9):1198-1211. 2017.

Petrillo C, Thorne LG, Unali G, Schirotti G, Giordano AMS, Piras F, Cuccovillo I, Petit SJ, Ahsan F, Noursadeghi M, Clare BS, Genovese P, Gentner B, Cittaro D, Naldini L, Towers GJ, Kajaste-Rudnitski A\*. Cyclosporine H Overcomes Innate Immune Restrictions to Improve Lentiviral Transduction and Gene Editing In Human Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell. 2018 Dec 6;23(6):820-832.e9.

Petrillo C, Calabria A, Piras F, Capotondo A, Spinozzi G, Cuccovillo I, Benedicenti F, Naldini L, Montini E, Biffi A, Gentner B, Kajaste-Rudnitski A\*. Assessing the impact of Cyclosporine A on lentiviral transduction and preservation of human hematopoietic stem cells in clinically relevant ex-vivo gene therapy settings. Hum Gene Ther. 2019 Apr 30.

Malattie Genetiche

Coordinator: Anna Kajaste-Rudnitski  
Duration (N. Years): 5  
Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16C03

**Disease Name:**

Genetic Disorders

**Keywords:**

HSC gene therapy, Innate Immunity, Vector-host interactions

## Poster P.20.134

### ADVANCED GENETIC ENGINEERING OF HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS

Ferrari S.<sup>[2]</sup>, Jacob A.<sup>[2]</sup>, Manzi M.<sup>[2]</sup>, Fiumara M.<sup>[2]</sup>, Mercuri E.<sup>[2]</sup>, Beretta S.<sup>[2]</sup>, Vavassori V.<sup>[2]</sup>, Albano L.<sup>[2]</sup>, Ranghetti A.<sup>[2]</sup>, Amabile A.<sup>[2]</sup>, Cittaro D.<sup>[1]</sup>, Lazarevic D.<sup>[1]</sup>, Merelli I.<sup>[3]</sup>, Lombardo A.<sup>[2]</sup>, Genovese P.<sup>[2]</sup>, Naldini L.\*<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy ~ Milan ~ Italy,

<sup>[3]</sup>National Research Council, Institute for Biomedical Technologies ~ Milan ~ Italy

Targeted gene editing (GE) holds therapeutic promise for several inherited blood diseases. Its application in hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) has been limited by low efficiency of homology-directed repair (HDR) in long-term repopulating HSPC and decreased engraftment due to ex-vivo manipulation. Here, we aimed to establish a transferable-to-the-clinic GE protocol by enhancing the total yield of edited HSPC. To identify the biological responses constraining GE efficiency in repopulating HSPC, we analyzed the transcriptional landscape of treated cells early after GE. We found that the innate response to viral delivery of HDR-donor template and the nuclease-induced DNA double-strand breaks induced p53-dependent DNA damage response delaying cell proliferation and decreasing host repopulation. Yet, transient p53 inhibition released cell cycle block, increased the yield of engrafting edited HSPC and boosted 5-fold the clonal composition within the edited human graft compared to control. Since HDR is restricted to cells engaged in S/G2 cell cycle phases, we screened a panel of adenoviral proteins to force cell cycle progression upon transient expression during GE. Adeno5 E4orf6/7 increased HDR efficiency by 50% in primitive HSPC inducing self-limiting cell cycle activation, without impairing clonogenic output. Combination of E4orf6/7 expression and p53 inhibition allowed high and stable editing efficiencies (50%) in the human graft, even in secondary recipients, with polyclonal composition and unperturbed clonal dynamics. A further strategy to increase the proportion of corrected cells within the graft is based on enrichment, and eventually expansion, of a pure population of HDR-edited cells before in vivo administration. We developed a selection strategy combining state-of-the-art GE protocol and transient overexpression of a selector gene by engineered transient activators. We achieved proof-of-principle of robust and specific selector transactivation in HDR-edited HSPCs, even when using clinically compliant selector, reaching up to 90% purity. We are also exploring the possibility of improving edited cells engraftment by coupling the treatment to upregulation of protein involved in phagocytosis protection (CD47) and niche homing (CXCR4). By transiently overexpressing these proteins we enhanced human HSPC engraftment in NSG mice. Moreover, when these CD47/CXCR4 overexpressing cells were transplanted in previously established human hematochimeric mice undergoing HSPC mobilization in the peripheral blood, the infused cells efficiently outcompeted the mobilized ones and established higher and more stable chimerism than controls, suggesting the possibility to engraft a relevant proportion of ex vivo treated HSPC without any genotoxic conditioning. Altogether, these results significantly improve the overall outcome of targeted GE in HSPC and give confidence towards its future clinical translation.

Ingegneria Genetica Innovativa di Cellule Progenitrici/Staminali Ematopoietiche

La modificazione genetica mirata (GE) è un promettente trattamento per diverse patologie ematologiche ereditarie. La sua applicazione su cellule staminali/progenitrici ematopoietiche (CSPE) è ostacolata da bassa efficienza di ricombinazione omologa (RO) in CSPE ripopolanti a lungo termine e basso attecchimento dopo manipolazione ex-vivo. In questo lavoro, vogliamo stabilire un protocollo

trasferibile alla clinica aumentando la quantità totale di CSPE modificate. Per identificare risposte biologiche limitanti l'efficienza di GE in HSPC, abbiamo analizzato il profilo trascrizionale di cellule trattate per GE. Abbiamo osservato che la risposta innata allo stampo virale per RO e la rottura del DNA da nucleasi avviano una risposta p53-dipendente, rallentando la proliferazione e diminuendo la ripopolazione dell'ospite. L'inibizione transiente di p53 rilascia l'arresto proliferativo, aumenta la frazione di CSPE modificate attecchite e incrementa 5 volte il numero di cloni nella popolazione attecchita rispetto al controllo. Visto che la RO è limitata a cellule in fase S/G2, abbiamo valutato un set di proteine adenovirali che forzano transientemente la progressione del ciclo durante GE. Adeno5-E4orf6/7 incrementa l'efficienza di RO del 50% in CSPE primitive attivando il ciclo cellulare, senza peggiorare la clonogenicità. La combinazione di espressione di E4orf6/7 e inibizione di p53 consente alte efficienze di modificazione (50%) nei trapianti di cellule umane, anche in riceventi secondari, con policlonalità e dinamiche clonali imperturbate. Un'ulteriore strategia per incrementare la frazione di cellule corrette si basa su arricchimento e possibile espansione di una popolazione pura di cellule modificate con RO prima dell'amministrazione in vivo. Abbiamo sviluppato una strategia di selezione combinando il protocollo attuale di GE e sovraespressione transiente con attivatori trascrizionali di geni selettori. Abbiamo ottenuto la prova di principio di robusta e specifica transattivazione in CSPE modificate con RO, usando selettori clinicamente compatibili e raggiungendo 90% di purezza. Stiamo esplorando la possibilità di migliorare l'attecchimento delle cellule corrette accoppiando il trattamento con la sovraespressione di proteine coinvolte in protezione della fagocitosi (CD47) e homing nella nicchia (CXCR4). Sovraesprimendole transientemente abbiamo aumentato l'attecchimento delle HSPC umane in topi NSG. Quando cellule CD47/CXCR4-sovraesprimenti sono trapiantate in modelli murini ematochimerici umani sottoposti a mobilitazione, le cellule infuse rimpiazzano le mobilizzate e stabiliscono più alto e stabile chimerismo dei controlli, suggerendo la possibilità di attecchimento di una porzione rilevante di CSPE trattate ex-vivo senza condizionamento genotossico. Nel complesso, questi risultati migliorano l'esito del GE e ne rinforzano il razionale per la traslazione clinica.

L. Naldini, Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351-360 (2015).

G. Schirotti, S. Ferrari, A. Conway, A. Jacob, V. Capo, L. Albano, T. Plati, M. C. Castiello, F. Sanvito, A. R. Gennery, C. Bovolenta, R. Palchaudhuri, D. T. Scadden, M. C. Holmes, A. Villa, G. Sitia, A. Lombardo, P. Genovese, L. Naldini, Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1. *Science translational medicine* 9, (2017).

Schirotti, G, Conti, A, Ferrari, S, della Volpe, L, Jacob, A, Albano, L, et al. (2019). Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response. *Cell Stem Cell* doi:10.1016/j.stem.2019.02.019.

Sindrome HIGM

Coordinator: Luigi Naldini

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16E04



**Disease Name:**

HIGM Syndrome

**Keywords:**

HIGM Syndrome, Genome Editing, Hematopoietic Stem Cells

## Poster P.20.135

### REGULATION OF PATHOGEN-SPECIFIC T-CELL RESPONSES IN PATIENTS WITH HYPER-IGE SYNDROME (HIES)

Vasco C.<sup>[2]</sup>, Baselli L.<sup>[1]</sup>, Carrabba M.<sup>[1]</sup>, Dellepiane R.<sup>[1]</sup>, Fabio G.<sup>[1]</sup>, Geginat J.\*<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Fondazione IRCCS Ca Granda, Ospedale maggiore Policlinico ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Fondazione Istituto Nazionale di Genetica Molecolare Romeo ed Enrica Invernizzi ~ Milano ~ Italy

Hyper-IgE syndrome (HIES) is a rare genetic disease caused by a defect of "Signal transducer and activation of transcription (STAT) 3", which plays a key role in regulating immune responses against pathogens. HIES patients have indeed on the one hand an inefficient response against opportunistic pathogens and suffer consequently from recurrent infections. This immunological defect is caused by an insufficient production of two soluble mediators, called Interleukin(IL)-17 and IL-22, by a central class of immune cells, the CD4+ T lymphocytes. On the other hand, as also indicated by the name of the disease, HIES patients have an exaggerated antibody production of the Immunoglobulin E (IgE) class, which induce allergic reactions like eczema. This second immunological defect is also the consequence of an inappropriate function of CD4+ T lymphocytes, because the latter can also produce soluble mediators, called IL-4 and IL-21, that induce the production of IgE. In this project, we will study the precise cellular and molecular mechanisms that leads to uncontrolled IgE production in the absence of STAT3 in CD4+ T lymphocytes from HIES patients and STAT3-deficient mice to understand if blocking IL-4 or IL-21 with specific antibodies could reduce IgE production and consequently probably also eczema in HIES patients. Moreover, we will try to expand and educate CD4+ T lymphocytes from HIES patients and STAT3-deficient mice that recognize the relevant opportunistic pathogens to produce IL-22 and/or IL-17 in a stable manner. These modified cells could then be reinfused into the same patients to improve the control of opportunistic infections. In addition to these putative future clinical impacts, this project will significantly advance our understanding of the role of STAT3 in CD4+ T lymphocytes and the immune system.

La sindrome da iper-IgE (HIES) è una rara malattia genetica causata da un difetto del "Trasduttore di segnale e attivazione della trascrizione (STAT) 3", che svolge un ruolo chiave nella regolazione delle risposte immunitarie contro i patogeni. I pazienti con HIES hanno infatti da un lato una risposta inefficiente contro agenti patogeni opportunistici e soffrono di conseguenza di infezioni ricorrenti. Questo difetto immunologico è causato da una produzione insufficiente di due mediatori solubili, chiamati Interleuchina (IL) -17 e IL-22, da una classe centrale di cellule immunitarie, i linfociti T CD4 +. D'altra parte, come indicato anche dal nome della malattia, i pazienti con HIES hanno una produzione di anticorpi esagerata di immunoglobuline di classe E (IgE), che inducono reazioni allergiche come l'eczema. Questo secondo difetto immunologico è anche la conseguenza di una funzione inappropriata dei linfociti T CD4 +, poiché quest'ultimi possono anche produrre mediatori solubili, chiamati IL-4 e IL-21, che inducono la produzione di IgE. In questo progetto, studieremo i meccanismi cellulari e molecolari che portano alla produzione incontrollata di IgE in assenza di STAT3 nei linfociti T CD4 + da pazienti HIES e in topi da laboratorio che non hanno il gene STAT3, per capire se bloccando IL-4 o IL-21 con specifici anticorpi si possa ridurre la produzione di IgE e di conseguenza probabilmente anche l'insorgenza di eczema nei pazienti con HIES. Inoltre, proveremo a espandere ed "educare" i linfociti T CD4 + da pazienti HIES e topi privi di STAT3, che riconoscono i patogeni

opportunistici rilevanti, per produrre IL-22 e/o IL-17 in modo stabile. Queste cellule modificate potrebbero quindi essere reinfuse negli stessi pazienti per migliorare il controllo delle infezioni opportunistiche. Oltre a questi possibili impatti clinici futuri, questo progetto migliorerà significativamente la nostra comprensione del ruolo di STAT3 nei linfociti T CD4 + e nel sistema immunitario.

1 Freeman AF, Holland SM. Clinical manifestations, etiology, and pathogenesis of the hyper-IgE syndromes. *Pediatr Res* 2009;65:32R-7R.

2 Yong PF, Freeman AF, Engelhardt KR, Holland S, Puck JM, Grimbacher B. An update on the hyper-IgE syndromes. *Arthritis Res Ther* 2012;14:228.

3 Puel A, Cypowyj S, Marodi L, Abel L, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:616-22.

4 Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008;452:773-6.

5 Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, et al. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med* 2008;205:1551-7.

6 Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, et al. Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:181-7.

7 Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007;448:1058-62.

Sindrome di Iper-IgE

Coordinator: Jens Geginat

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019-2020

**Telethon Project (nr):**

GGP19323

**Disease Name:**

Hyper-Ige Syndrome (HIES)

**Keywords:**

STAT3, Th17, IgE

## Poster P.20.136

### EXPLORING THE PATHOGENETIC BASIS OF ICF SYNDROME WITH HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

Poondi--Krishnan V.<sup>[1]</sup>, Morone B.<sup>[1]</sup>, Manco R.<sup>[1]</sup>, Toubiana S.T.<sup>[2]</sup>, Krzak M.<sup>[3]</sup>, Selig S.<sup>[2]</sup>, Angelini C.<sup>[3]</sup>, Strazzullo M.<sup>[1]</sup>, Matarazzo M.R.<sup>\*(1)</sup>

<sup>[1]</sup>Institute of Genetics and Biophysics "ABT" - CNR ~ Napoli ~ Italy, <sup>[2]</sup>Molecular Medicine Laboratory, Rambam Health Care Campus and Rappaport Faculty of Medicine, Technion ~ Haifa ~ Israel, <sup>[3]</sup>Istituto per le Applicazioni del Calcolo "Mauro Picone" – CNR ~ Napoli ~ Italy

The Immunodeficiency, Centromeric Instability, Facial anomalies (ICF; OMIM 242860) syndrome is a genetically heterogeneous rare autosomal recessive immunological/neurological disorder characterized by loss of DNA methylation and chromosome instability, mainly involving the (peri)centromeric repeats (1,2). Hypomorphic biallelic mutations in DNMT3B gene impair the catalytic activity of the major de novo DNA methyltransferase active during early development, resulting in hypomethylation across the genome (3-6). These mutations account for approximately 60% of cases classified as ICF syndrome type1 (ICF1) patients (2). Explaining the molecular mechanisms underlying ICF1 pathogenesis has remained difficult due to the lack of well-suited cellular models. Recent generation of ICF1 patients'-derived induced pluripotent stem cells (ICF1-iPSCs) provided an appropriated model for studying the early-stage pathogenetic mechanisms of ICF1 syndrome and for deciphering the genomic targets that are affected during early development (7).

By performing gene-editing through the CRISPR/Cas9 technology we generated isogenic iPSC cell lines with corrected DNMT3B mutations from patients carrying missense and/or null mutations that disrupt the catalytic domain of DNMT3B.

Focusing on repetitive regions, we show that in contrast to pericentromeric repeats, which reacquire normal DNA methylation in corrected clones, the majority of subtelomeres acquire only partial DNA methylation and, accordingly, the telomeric ICF1 phenotype persists. Subtelomeres resistant to de novo methylation were characterized by abnormally high H3K4 trimethylation (H3K4me3), and short-term reduction of H3K4me3 by pharmacological intervention partially restored subtelomeric DNA methylation. These findings demonstrate that the abnormal epigenetic landscape established in ICF1 cells restricts the recruitment of DNMT3B (8).

To verify whether and at what extent the DNA methylation at early-stage DNMT3B targets is restored across the genome following the editing, the ICF1-iPSCs and their corrected counterparts are currently examined through an integrated epigenomic and transcriptomic approach.

ICF syndrome is considered primarily as a humoral immunodeficiency disease; however, this does not explain the high rate of opportunistic infections. It has been suggested that an additional intrinsic T-cell deficiency and a lymphocyte proliferation defect are present in individual ICF1 patients (9). Therefore, in vitro differentiation of ICF1-iPSCs towards hematopoietic progenitors and lymphoid lineage is anticipated to provide an efficient tool to model and understand disease-related mechanisms and in perspective to implement cellular transplantation therapeutic approaches (10). Accordingly, we generated CD45+ enriched progenitors from iPSCs and plan to develop suitable approaches to further differentiate the CD45+ cells toward the B-cell lineage.

La sindrome da Immunodeficienza, instabilità Centromerica e anomalie Facciali (ICF; OMIM 242860) è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva estremamente rara descritta finora in circa 70 pazienti. Ad oggi sono stati identificati quattro geni, le cui mutazioni spiegano quasi totalmente i casi di sindrome ICF finora noti (ICF 1-4). Oltre il 60% dei pazienti presenta mutazioni missenso e nonsense in eterozigosi nel gene codificante la DNA metiltransferasi de novo 3B (DNMT3B; ICF1), che interferiscono severamente con l'attività catalitica della proteina, determinando ipometilazione variabile nel genoma.

La malattia si manifesta prevalentemente nella prima infanzia con una grave immunodeficienza che comporta estrema suscettibilità alle infezioni respiratorie e/o del tratto gastrointestinale e morte in età pediatrica. Nei pazienti si riscontrano inoltre specifiche alterazioni cromosomiche, e frequentemente difetti di crescita, ritardo psicomotorio e lievi dismorfismi. La sindrome ICF è molto probabilmente sotto-diagnosticata, specialmente in casi con fenotipo incompleto e/o in casi sporadici.

Essendo una malattia estremamente rara il reclutamento di cellule primarie da pazienti è particolarmente difficile. A questa difficoltà si aggiunge che per questa sindrome i modelli murini umanizzati attualmente disponibili non riproducono i difetti immunologici caratteristici della patologia. Tenuto conto di queste forti limitazioni, abbiamo proposto l'applicazione di una strategia adatta a studiare i meccanismi patogenetici di sindromi complesse quali l'ICF, ovvero l'utilizzo di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs). A tale scopo, sono state recentemente generate iPSCs da fibroblasti di individui affetti portatori di mutazioni nel gene DNMT3B. Queste cellule sono state utilizzate per studiare i meccanismi patogenetici alla base dei difetti della risposta immunitaria tipici della sindrome ICF. In particolare, è stato valutato il potenziale differenziativo delle ICF1-iPSC verso precursori ematopoietici, al fine di esaminare l'effetto delle mutazioni in DNMT3B durante il differenziamento. Inoltre, esse sono state impiegate in un protocollo di terapia cellulare per la correzione in vitro di tali mutazioni mediante la tecnologia CRISPR/Cas9. Tale modello cellulare fornirà strumenti di alto valore scientifico adatti a rispondere a questioni peculiari della malattia altrimenti non esplorabili nelle cellule del sangue derivanti dai pazienti.

1. Ehrlich, M. (2003). The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clinical Immunology*, 109(1), 17–28.
2. Weemaes, C. M. R., van Tol, M. J. D., Wang, J., van Ostaijen-ten Dam, M. M., van Eggermond, M. C. J., et al. (2013). Heterogeneous clinical presentation in ICF syndrome: correlation with underlying gene defects. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 21(11), 1219–25.
3. Matarazzo MR, Boyle S, D'Esposito M, Bickmore WA. (2007). Chromosome territory reorganization in a human disease with altered DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16546–16551
4. Gatto S, Della Ragione F, Cimmino A, Strazzullo M, Fabbri M, Mutarelli M, Ferraro L, Weisz A, D'Esposito M, Matarazzo MR. Epigenetic alteration of microRNAs in DNMT3B-mutated patients of ICF syndrome. *Epigenetics*. (2010) Jul 1;5(5):427-43.
5. Leppert S and Matarazzo MR. De Novo DNMTs and DNA Methylation: Novel Insights into Disease Pathogenesis and Therapy from Epigenomics. *Curr Pharm Des*. 2014;20:1812-8.
6. Gatto, S., Gagliardi, M., Franzese, M., Leppert, S., Papa, M., et al. (2017). ICF-specific DNMT3B dysfunction interferes with intragenic regulation of mRNA transcription and alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 38, 576–589.
7. Sagie, S., Ellran, E., Katzir, H., Shaked, R., Yehezkel, S., et al. (2014). Induced pluripotent stem cells as a model for telomeric abnormalities in ICF type I syndrome. *Human Molecular Genetics*, (15), 1–12.
8. Toubiana S, Gagliardi M, Papa M, Tzukerman M, Matarazzo MR\*, Selig S.\* Persistent epigenetic

memory impedes rescue of the telomeric phenotype in human ICF iPSCs following DNMT3B correction. \*Co-corresponding authors. *Elife*, in revision (22-04-2019-RA-eLife-47859).

9. Blanco-Betancourt, C. E., Moncla, A., Milili, M., Jiang, Y. L., Viegas-Péquignot, E. M., et al. (2004). Defective B-cell-negative selection and terminal differentiation in the ICF syndrome. *Blood*, 103(7), 2683–90.

10. Gennery, A. R., Slatter, M. a, Bredius, R. G., Hagleitner, M. M., Weemaes, C., et al (2007). Hematopoietic stem cell transplantation corrects the immunologic abnormalities associated with immunodeficiency-centromeric instability-facial dysmorphism syndrome. *Pediatrics*, 120(5), e1341-4.

Sindrome da Immunodeficienza, instabilità Centromerica, anomalie Facciali (ICF)

Coordinator: Maria R. Matarazzo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15209

**Disease Name:**

ICF Syndrome

**Keywords:**

DNA methylation, iPSCs, gene editing

## Poster P.20.137

### IDENTIFICATION AND THERAPY OF COMBINED IMMUNODEFICIENCIES AND ADENOSINE DEAMINASE 2 DEFICIENCY

Brigida I.<sup>[1]</sup>, Zoccolillo M.<sup>[1]</sup>, Cicalese M.P.<sup>[2]</sup>, Hernandez R.J.<sup>[1]</sup>, Barzaghi F.<sup>[2]</sup>, Sartirana C.<sup>[1]</sup>, Sergi L.<sup>[1]</sup>, Scala S.<sup>[1]</sup>, Basso--Ricci L.<sup>[1]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Mortellaro A.<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>

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

<sup>[2]</sup>Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Combined Immunodeficiencies (CID) are a heterogeneous group of genetic immune disorders, characterized by overlapping clinical signs and symptoms. Next-generation sequencing (NGS) has tremendously expanded the array of new defects in immune-related genes. To identify disease causative genes, we developed five target panels for Ion Torrent and Haloplex target system sequencing platforms. The complementary use of the two targeted sequencing approaches allowed the identification of causative variants in 28.6% of 105 patients<sup>1</sup>. In six unrelated patients, we identified new mutations in the ARPC1B gene encoding a protein required for the regulation of the actin cytoskeleton mediated by the ARP2/3 complex. Absence/low expression of ARPC1B in T cells resulted in impaired TCR-mediated proliferation and SDF-1 $\alpha$ -directed migration. ARPC1B correction by a lentiviral vector (LV)-mediated gene transfer approach restored ARPC1B expression and improved in vitro proliferation of patients' T cells<sup>2</sup>. Additional studies are ongoing for the characterization of a new CID caused by mutations in the CECR1 gene encoding the adenosine deaminase 2 (ADA2). Patients with ADA2 deficiency (DADA2) suffer from vasculitis, lacunar stroke, cerebral hemorrhages, systemic inflammation, cytopenia, and B-cell deficiency<sup>3,4</sup>. If undiagnosed or left untreated, DADA2 patients are at high risk of severe disability or death. Safe and targeted therapeutic options for DADA2 patients need to be rapidly developed. We generated a lentiviral vector (LV) encoding ADA2 to transduce CD34+ hematopoietic stem-progenitor cells (HSPCs) isolated from DADA2 patients and healthy donors (HD) and assess the efficacy and toxicity of ADA2 gene transfer. LV-mediated overexpression of ADA2 in HDs' HSPCs was not toxic, and cells maintained a normal clonogenic potential in vitro. Immunological reconstitution was efficiently achieved in humanized mice, and preliminary results showed a selective advantage of B and myeloid cells in mice receiving ADA2-transduced human CD34+ cells compared to those transplanted with GFP-transduced CD34+ cells. To study the correction of the DADA2-associated immune defects, we generated an ADA2-deficient (KO) U937 monomyelocytic cell line by CRISPR/Cas9 approach. ADA2 KO U937 cells well recapitulated the pro-inflammatory features observed in macrophages of DADA2 patients. Specifically, loss of ADA2 resulted in high expression of TNF and interferon stimulated-genes, and an imbalanced M1/M2 macrophage differentiation toward a pro-inflammatory M1 phenotype. Experiments assessing the LV-mediated correction of immune dysregulation in DADA2 macrophages are currently ongoing. In conclusion, NGS is a valuable diagnostic platform for the identification of new causative variants or genes that contribute to CID, and ADA2-encoding LV represents a powerful tool for the preclinical development of a gene therapy approach for DADA2.

Identificazione e terapia delle immunodeficienze combinate e del deficit di adenosina deaminasi 2

Le immunodeficienze combinate (CID) sono un gruppo eterogeneo di difetti immunologici

caratterizzato da segni e sintomi clinici sovrapponibili. L'utilizzo di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha ampliato enormemente la gamma di nuovi difetti immuno-correlati. Abbiamo sviluppato 5 pannelli per le piattaforme di sequenziamento Ion Torrent e Haloplex per l'identificazione dei geni che causano la malattia in pazienti CID. L'uso complementare dei due approcci ha permesso di identificare varianti causali nel 28,6% dei 105 pazienti analizzati<sup>1</sup>. Inoltre, abbiamo identificato in sei pazienti nuove mutazioni nel gene ARPC1B che codifica una proteina necessaria per la regolazione del citoscheletro. Per la prima volta abbiamo descritto difetti di proliferazione e migrazione delle cellule T, che sono state corrette mediante il trasferimento genico di ARPC1B con un vettore lentivirale (LV)<sup>2</sup>. Ci stiamo inoltre occupando di caratterizzare una nuova CID causata dal deficit di adenosina deaminasi 2 (ADA2). I pazienti presentano vasculite, difetti neurologici, infiammazione sistemica e difetto delle cellule B<sup>3,4</sup>. La varietà dei sintomi rende la malattia invalidante, potenzialmente letale e difficile da diagnosticare. La terapia genica potrebbe rappresentare una speranza di cura per questi pazienti. Abbiamo sviluppato un LV per il trasferimento genico di ADA2 in cellule ematopoietiche staminali CD34+ di pazienti DADA2 e donatori sani (HD). L'overespressione di ADA2 nelle cellule CD34+ di HD non è tossica, le cellule mantengono in vitro un potenziale clonogenico normale. Quando trapiantate in topi umanizzati, le cellule CD34+ ADA2 trasdotte attecchiscono, differenziano in cellule mature con una espansione preferenziale dei linfociti B e cellule mieloidi. Per studiare la correzione dei difetti immunologici associati a DADA2, abbiamo generato una linea cellulare monomelicitica U937 mancante (KO) di ADA2. Le cellule U937 ADA2 KO ricapitolano bene le caratteristiche pro-infiammatorie osservate nei macrofagi dei pazienti DADA2. Sono in corso esperimenti per valutare se il trasferimento genico di ADA2 nelle U937 ADA2 KO e nei monociti di pazienti sia in grado di correggere il fenotipo pro-infiammatorio e il difetto di polarizzazione di macrofagi anti-infiammatori di tipo M2. In conclusione, NGS è una eccellente piattaforma diagnostica per l'identificazione di nuove varianti o nuovi geni causativi delle CID, e inoltre, abbiamo dimostrato che il LV codificante ADA2 rappresenta un potente strumento per lo sviluppo preclinico di un approccio di terapia genica per DADA2.

1. Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, et al. Targeted NGS platforms for genetic screening and gene discovery in primary immunodeficiencies. *Front Immunol.* 2019 Apr 11.
2. Brigida I, Zoccolillo M, Cicalese MP, et al. T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood.* 2018;132(22):2362-2374.
3. Navon Elkan P, Pierce SB, Segel R, et al. Mutant adenosine deaminase 2 in a polyarteritis nodosa vasculopathy. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(10):921–31.
4. Zhou Q, Yang D, Ombrello AK, et al. Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(10):911–20.

Immunodeficienze combinate e Immunodeficienza da deficit di adenosina deaminasi 2

Coordinator: Aiuti Alessandro

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

TGT16C06

**Disease Name:**

Combined immunodeficiencies Adenosine Deaminase 2



**Keywords:**

Combined immunodeficiencies, Adenosine deaminase 2 deficiency, Gene therapy

## Poster P.20.138

### TARGETED GENOME EDITING IN RECOMBINATION ACTIVATING GENE 1 (RAG1): A PRECISE CORRECTION OF THE GENETIC DEFECT IN HUMAN SCID

Castiello M.C.<sup>[1]</sup>, Sacchetti N.<sup>[2]</sup>, Draghici E.<sup>[1]</sup>, Vavassori V.<sup>[1]</sup>, Ferrari S.<sup>[1]</sup>, Notarangelo L.D.<sup>[3]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Genovese P.<sup>[1]</sup>, Villa A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy SR-Tiget, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Vita-Salute San Raffaele University ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>National Institute of Allergy and Infectious Diseases- National Institutes of Health, Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology-Division of Intramural Research ~ Bethesda ~ United States of America

Defects in Recombination activating gene 1 and 2 (RAG) result in a broad spectrum of clinical manifestations including a complete block in T and B cells differentiation, leaky severe combined immunodeficiency (SCID) or atypical SCID with granuloma<sup>1</sup>. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the treatment of choice, however its success is limited by the availability of compatible donors and the severe side-effects caused by the myeloablative conditioning required to achieve long-term immune reconstitution<sup>2,3</sup>. Conventional gene therapy is an attractive therapeutic option; but its applicability is constrained by the need of a physiological expression of RAG1 gene. Preclinical data indicate that a low RAG1 expression results in severe immune dysregulation, while high vector copy number may lead to the risk of insertional mutagenesis caused by integrating viral vector<sup>4,5,6</sup>. To overcome these problems, we set up a gene editing platform based on engineered nucleases to restore the expression of the corrective human RAG1 cDNA under the physiological control of its endogenous promoter. To this purpose, we developed a gene editing strategy by targeting the intronic region located at the 5' of the second exon of the gene, which contains the entire coding sequence thus allowing the correction of all pathological mutations. We identified the best performing CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex that allows a high level of cutting activity (by NHEJ-mutagenesis assay) and efficient editing (homology directed repair assay) in K562 and NALM6 cell lines. In parallel, we have developed an adeno associated virus type 6 (AAV6) donor DNA carrying the human codon optimized RAG1 cDNA followed by BGH polyA sequence. Currently, we are validating this platform in human CD34+ cells obtained from cord blood and mobilized peripheral blood of normal donors and RAG1 patients by in vitro and in vivo analyses. In parallel, we identified the minimal number of gene-targeted cells necessary to achieve therapeutic levels of immune reconstitution by competitive transplantation in Rag1<sup>-/-</sup> mice and in parallel we tested novel conditioning regimen. We demonstrated that 10-20% of wild type Lineage negative cells is required to obtain immune reconstitution in Rag1<sup>-/-</sup> mice. Finally, mice treated with non genotoxic conditioning mediated by antiCD45-Saporin7 showed robust immunological reconstitution comparable to fully myeloablative conditioning, while preserving central lymphoid organs.

Difetti nei geni Rag1 e Rag2 causano un ampio spettro di manifestazioni cliniche che vanno dalla assenza di linfociti T e B, alle forme di SCID atipica alle immunodeficienze con granuloma. Il trapianto di midollo osseo è la terapia di elezione, tuttavia il suo successo è limitato dalla disponibilità di donatori compatibile e da possibili effetti secondari del condizionamento. La terapia genica potrebbe costituire una possibile strategia, tuttavia il suo successo è limitato in quanto il gene RAG1 è regolato finemente durante il ciclo cellulare. Esperimenti di terapia genica hanno dimostrato come bassa

espressione del gene Rag1 porti a immune disregolazione, mentre elevate espressione causata da alto vector copy number potrebbe portare a instabilità genomica. Per superare tali problemi abbiamo quindi allestito una piattaforma di editing, targettando la regione al 5' dell'esone 2 che contiene tutta la regione coding di RAG1 e dove mappano la maggior parte di tutte le mutazioni finora riportate in letteratura. Abbiamo pertanto identificato la migliore complesso ribonucleoproteico CRISPR-Cas9 con alto livello di cutting valutato come test di mutagenesi NHEJ ed efficiente editing (homology directed repair assay) in linee cellulari K562 e NALM6. In parallelo abbiamo sviluppato un vettore Adeno associato (AAV6) che porta un donor DNA contenente il cDNA umano di RAG1 codon optimized seguito dalla sequenza di polyA. Stiamo ora validando tale piattaforma in cellule CD34 ottenute da cordone e da mobilizzato facendo sia saggi in vitro che in vivo. In parallelo abbiamo identificato il minimo numero di cellule necessarie per raggiungere livelli terapeutici di immunoricostruzione mediante esperimenti di trapianto competitivo in topi Rag1<sup>-/-</sup>. Inoltre abbiamo testato nuovi regimi di condizionamento usando un composto non genotossico mediante anticorpo diretto contro CD45 coniugato con immuno tossina (saporin). I topi trattati con tali composti hanno dimostrato un buon livello di immunoricostruzione simile a quello raggiunto da regimi di condizionamento mieloablativo, ma al contempo preservando la morfologia degli organi linfoidi7.)

1. Villa A, Notarangelo LD. RAG gene defects at the verge of immunodeficiency and immune dysregulation. *Immunol Rev.* 287(1):73-90, 2019
2. Haddad et al. SCID genotype and 6-month posttransplant CD4 count predict survival and immune recovery. *Blood* 132:1737-1749, 2018
3. Schuetz et al, SCID patients with ARTEMIS vs RAG deficiencies following HCT: increased risk of late toxicity in ARTEMIS-deficient SCID. *Blood*123: 281-9, 2014
4. Lagresle-Peyrou, C et al. Long-term immune reconstitution in RAG-1-deficient mice treated by retroviral gene therapy: a balance between efficiency and toxicity. *Blood* 107, 63-72,2006
5. Pike-Overzet, K.et al. Correction of murine Rag1 deficiency by self-inactivating lentiviral vector-mediated gene transfer. *Leukemia* 25, 1471-1483,2011.
6. Van Til, N.P et al. Recombination-activating gene 1 (Rag1)-deficient mice with severe combined immunodeficiency treated with lentiviral gene therapy demonstrate autoimmune Omenn-like syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* 133, 1116-1123,2014.
7. Palchaudhuri R et al. Non-genotoxic conditioning for hematopoietic stem cell transplantation using a hematopoietic-cell-specific internalizing immunotoxin. *Nat Biotechnol.*34:738–45,2016.

Immunodeficienza combinata da difetto RAG1

Coordinator: Anna Villa

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16E02

**Disease Name:**

RAG1 Severe Combined Immunodeficiency

**Keywords:**

RAG1 defect, Gene Editing, Severe Combined Immunodeficiency

## Poster P.20.139

### NOVEL STRATEGIES TO GENERATE TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS FOR ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY

Passerini L.\*, Santoni De Sio F., Annoni A., Amodio G., Avancini D., Andolfi G., Passeri L., Fresolone L., Fortunato M., Gregori S.

*San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute, ~ MILAN ~ Italy*

Dendritic cells (DC) dictate immune responses by instructing T cells to respond to dangerous stimuli or to promote tolerance. DC-10 are IL-10-producing DC characterized by HLA-G and ILT4 expression that play a pivotal role in promoting tolerance via T regulatory cells (Tregs). We identified CD141 and CD163 that in combination with CD14 and CD16 enables the ex vivo identification of DC-10 (1). Using these markers we showed a lower frequency of DC-10 and higher proportion of pro-inflammatory cells is present pre-symptomatic and in symptomatic type 1 diabetic subject, indicating that circulating DC-10 may represent a biomarker of tolerance.

To improve the knowledge on DC-10, we analyzed the chromatin status and the transcriptome of DC-10. ATAC-seq led to the identification of DC-10 specific open chromatin regions and regulator elements (RE), putatively controlling target genes. Gene set enrichment analysis confirmed that identified target genes as over-expressed core, in which the DC-10 marker CD163, members of the LIR family and other Inhibitory receptors, and chemokine receptors and ligands putatively associated to tolerogenic functions were found. Transcription factors (TF) binding motif analysis revealed an enrichment for a well-known tolerogenic TF in T cells, binding sites. TF inhibition during DC-10 differentiation affects their phenotype, while TF activation during DC differentiation allows the up-regulation of DC-10 associated markers. Once validated, our findings will provide a comprehensive network of players that regulate tolerogenic pathways and will help identifying new molecular tools to induce or restore tolerance.

We generated stable tolerogenic DC suitable for cell-based approaches, using lentiviral vectors (LV) encoding for IL-10 in combination with i) a marker gene, or ii) a given antigen(Ag)-derived peptide fused the invariant chain, leading to stable presentation of the encoded Ag to both CD4+ and CD8+ T cells. In the first case engineered DC present alloAgs to prevent graft rejection, while in the second case engineered DC stably present the encoded Ag to modulate autoimmunity. In both cases the presence of sustained levels of IL-10 will dampen pathogenic immune responses and promote/restore tolerance via Ag-specific Treg induction. DC transduced with LV co-encoding for IL-10 and marker gene or with LV co-encoding for IL-10 and invariant chain + peptide Ag secrete sustained levels of IL-10 in steady state and upon activation, but not IL-12; are phenotypically and functionally stable upon activation; modulate CD4+ and CD8+ T cell responses in vivo and in vitro; differentiate CD4+ T cells into Ag-specific Tregs in vitro. The combination of state-of-the-art LV-based strategy and the use of Ag-derived peptides makes our approach attractive to generate stable and effective human engineered DC for therapeutic applications in the context of organ transplantation and autoimmune diseases.

Le cellule dendritiche (DC) modulano le risposte immunitarie istruendo le cellule T a rispondere ai patogeni o a promuovere la tolleranza. Le DC-10 sono DC che producono IL-10, esprimono HLA-G e ILT4 e svolgono un ruolo fondamentale nel promuovere la tolleranza attraverso l'induzione delle cellule T regolatorie (Tregs). Abbiamo identificato il CD141 e CD163 che in combinazione con CD14 e

CD16 consentono l'identificazione delle DC-10 in vivo (1). Usando tali marcatori abbiamo evidenziato una frequenza più bassa di DC-10 nei soggetti diabetici, dati a sostegno del potenziale uso delle DC-10 come marcatori di tolleranza

Per caratterizzare le DC-10, abbiamo analizzato lo stato della cromatina e il trascrittoma. L'analisi ha portato all'identificazione di elementi regolatori (RE) specifici delle DC-10 che controllando l'espressione di diversi dei geni. L'analisi "Gene set enrichment" ha confermato che tra i target genetici delle RE sono presenti geni over-espressi nelle DC-10: il CD163, marcatore delle DC-10, membri della famiglia LIR, altri recettori inibitori e recettori e ligandi di chemochine che possono essere associati a funzioni tollerogeniche. L'analisi del motivo di legame dei fattori di trascrizione (TF) ha permesso di identificare un noto TF tollerogenico nelle cellule T. L'inibizione di tale TF durante la differenziazione delle DC-10 influenza il loro fenotipo, mentre la sua attivazione durante il differenziamento delle DC consente l'up-regolazione di marcatori associati alle DC-10. Una volta validati, i nostri risultati potranno fornire informazioni sui pathways che regolano la tolleranza e aiuteranno ad identificare nuovi target molecolari utili per indurre o ripristinare la tolleranza.

Abbiamo generato cellule DC tollerogeniche mediante uso di vettori lentivirali (LV) che esprimono IL-10 in combinazione con i) un gene marcatore, o ii) un peptide antigenico (Ag) fuso con la catena invariante, che permette la presentazione dell'Ag codificato alle cellule T CD4+ e CD8+. Nel primo caso le cellule DC ingegnerizzate presentano alloAg e sono utilizzabili per prevenire il rigetto di trapianti, nel secondo caso le cellule DC ingegnerizzate presentano autoAg e sono utilizzabili per modulare l'autoimmunità. In entrambi i casi la presenza di IL-10 inibisce le risposte immunitarie patologiche e promuove/ripristinare la tolleranza attraverso l'induzione di cellule Tregs. DC trasdotte con vettori che esprimono IL-10 e un gene marker e DC trasdotte con vettori che esprimono IL-10 e peptide secernono livelli sostenuti di IL-10, ma non di IL-12; sono fenotipicamente e funzionalmente stabili; modulano le risposte delle cellule T CD4+ e CD8+; e promuovono il differenziamento di cellule Tregs. La combinazione di vettori lentivirali e l'uso di peptidi derivati da Ag rende il nostro approccio attraente per la generazione di cellule DC per applicazioni terapeutiche nel contesto del trapianto di organi e delle malattie autoimmuni.

1. Comi M., Avancini D., Santoni de Sio F., Villa M., Uyeda M.J., Floris M., Tomasoni D., Bulfone A., Roncarolo M.G., Gregori S. Co-expression of CD163 and CD141 identifies human circulating IL-10-producing dendritic cells (DC-10). *Cell Mol Immunol.* 2019 Mar 6. doi: 10.1038/s41423-019-0218-0.

Diabete Tipo 1, Mucopolisaccaridosi Tipo 1

Coordinator: Silvia Gregori

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16G01

**Disease Name:**

T Cell Mediated Diseases

**Keywords:**

TOLERANCE, LENTIVIRAL VECTORS, IMMUNOTHERAPY

## Poster P.20.140

### HSPC BIOLOGY: IN VIVO CLONAL TRACKING AND LINEAGE MODELING

**Scala S.\*<sup>[1]</sup>**, Basso--Ricci L.<sup>[1]</sup>, Quaranta P.<sup>[1]</sup>, Dionisio F.<sup>[1]</sup>, Omrani M.<sup>[1]</sup>, Naldini M.M.<sup>[1]</sup>, Barcella M.<sup>[1]</sup>, Calabria A.<sup>[1]</sup>, Salerio F.A.<sup>[1]</sup>, Monti I.<sup>[1]</sup>, Giannelli S.<sup>[1]</sup>, Darin S.<sup>[2]</sup>, Migliavacca M.<sup>[2]</sup>, Merelli I.<sup>[1]</sup>, Gattillo S.<sup>[3]</sup>, Ostuni R.<sup>[1]</sup>, Ciceri F.<sup>[3]</sup>, Gentner B.<sup>[1]</sup>, Bernardo M.E.<sup>[1]</sup>, Ferrua F.<sup>[1]</sup>, Cicalese M.P.<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), San Raffaele Scientific Institute, ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Division of Immunology, Transplantation, and Infectious Diseases, Immunohematology and transfusion medicine, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Gene therapy (GT) is based on infusion of gene-modified autologous Hematopoietic Stem/Progenitor cells (HSPC) isolated from BM or mobilized peripheral blood (MPB), to correct inherited disorders. HSPC mobilization for GT is usually obtained through administration of G-CSF (G) and Plerixafor (P). Some circulating HSPC (cHSPC) can also be found in peripheral blood (PB) of un-mobilized subjects. Combining phenotypic characterization, transcriptome profiling using single-cell RNA sequencing (scRNAseq), functional assays and integration site clonal tracking, we are studying the behavior and fate of resident, circulating and mobilized HSPC in physiological conditions and after GT. To monitor hematopoietic reconstitution post-GT, we exploited a novel flow-cytometry assay capable of quantifying 23 different blood cell types, including HSPC subsets, in BM, MPB or PB samples (Basso-Ricci et al, 2017).

We described the in vivo reconstitution dynamics of 7 HSPC subtypes including hematopoietic stem cells (HSC), multipotent progenitors (MPP) and lymphoid- or myeloid-committed precursors in 6 Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) patients up to 5 years after ex vivo GT. Steady-state hematopoiesis, with stable HSPC compartment, was reached around 1-2 years post-GT with a lentiviral vector. Additive Bayesian network modeling suggests that short-living MPP were more active in the early phases and were replenished around 1 year after GT by long-living HSC, which then remained in charge of the hematopoietic output. This implies that long-term HSC, that were activated in vitro, were capable of homing and resilience upon re-infusion (Scala et al. 2018).

The analysis of CD34+ cell composition before transduction revealed that primitive HSC were present in both BM and MPB-HSPC sources with higher amounts of primitive and myeloid-committed progenitors in MPB. This latter finding, may explain the rapid neutrophil engraftment and platelet transfusion independence in MPB-GT, in line with the observations in transplanted patients. Similar myeloid and lymphoid reconstitution was observed in BM and MPB-GT groups from 1-year post-GT implying that both HSPC sources have similar long-term repopulating properties.

We are also studying HSPC trafficking in physiological conditions and after mobilization. We found that cHSPC are enriched for multipotent lymphoid progenitors and preliminary scRNAseq results unveiled a higher lymphoid and erythroid signature in PB vs. BM HSPC. On the other hand, we observed enrichment of both primitive and myeloid progenitors after administration of G, followed by an increase of lymphoid progenitor contribution after administration of P. We also found that primitive HSPC amounts in PB after G+P administration correlated with their counts before mobilization in both PB and BM. Understanding the molecular players controlling HSPC trafficking will provide novel potential targets for innovative HSPC mobilization strategies.

Tracking clonale delle cellule staminali e dei progenitori ematopoietici in vivo in esseri umani. La terapia genica (GT) si basa sull'infusione di cellule staminali/progenitrici ematopoietiche (HSPC) autologhe, isolate dal midollo osseo (BM) o da sangue periferico mobilizzato (MPB), modificate geneticamente per correggere malattie ereditarie. La mobilizzazione delle HSPC per GT si esegue somministrando G-CSF (G) e Plerixafor (P). Alcune HSPC circolanti (cHSPC) si possono trovare anche nel sangue periferico (PB) di soggetti non mobilizzati. Combinando analisi di caratterizzazione fenotipica e trascrizionale a singola cellula (scRNA), saggi funzionali e tracking clonale dei siti di integrazione, il nostro progetto ha lo scopo di studiare la biologia e le dinamiche delle cellule HSPC residenti nel BM, di quelle circolanti nel PB e di quelle mobilizzate sia in contesti fisiologici che dopo GT. Per monitorare la ricostituzione ematopoietica nei pazienti dopo GT, abbiamo sviluppato un nuovo saggio di citometria capace di quantificare 23 tipi cellulari diversi, HSPC incluse, nel BM, nel PB e nel MPB, (Basso-Ricci et al, 2017).

Studiando le dinamiche di ricostituzione di 7 sottopopolazioni di HSPC, tra cui le cellule staminali ematopoietiche (HSC) e i progenitori multi-potenti (MPP), in 6 soggetti con Sindrome di Wiskott-Aldrich trattati con GT, abbiamo osservato che i pazienti raggiungono un'ematopoiesi e un compartimento HSPC stabile a partire da 1-2 anni dalla GT. Modelli statistici indicano che le MPP sono più attive nella fase iniziale post-GT e sono sostituite a 1 anno dalle HSC a lungo termine, che sono poi responsabili del mantenimento dell'ematopoiesi. Ciò implica che HSC attivate in vitro, sono capaci di fare homing e rimanere inattive dopo infusione (Scala et al 2018).

Abbiamo inoltre osservato che cellule HSC sono presenti sia nel BM che nel MPB e che progenitori mieloidi sono in maggiore frequenza nel MPB. Ciò potrebbe spiegare il rapido attecchimento di neutrofili e la veloce indipendenza da trasfusioni di piastrine nei pazienti MPB-GT, come descritto nei pazienti trapiantati. Ad 1 anno dalla GT, pazienti BM-GT e MPB-GT mostrano simile ricostituzione ematopoietica, indicando che HSPC da BM e MPB hanno analoghe capacità a lungo termine.

Stiamo studiando inoltre la circolazione delle HSPC in situazioni fisiologiche e durante la mobilizzazione. Secondo i nostri dati, le cHSPC hanno un'alta frequenza di progenitori linfoidi e analisi di scRNA confermano un'attività trascrizionale tipica delle cellule linfoidi ed eritroidi. Inoltre abbiamo osservato che dopo G, le HSPC sono composte da progenitori primitivi e mieloidi, mentre aumenta la componente linfoide dopo P. Inoltre, la quantità di cellule primitive mobilizzate dopo G+P correla con il loro numero pre-mobilizzazione sia nel BM che nel PB. L'identificazione dei meccanismi alla base della circolazione delle HSPC aiuterà ad individuare nuove strategie per la mobilizzazione delle HSPC.

Basso-Ricci L, Scala S, Milani R, et al. Multiparametric Whole Blood Dissection: A One-Shot Comprehensive Picture of the Human Hematopoietic System. *Cytom. Part A.* 2017;91A(10):952–965.  
Scala S, Basso-Ricci L, Dionisio F, et al. Dynamics of genetically engineered hematopoietic stem and progenitor cells after autologous transplantation in humans. *Nat. Med.* 2018;24:1683–1690.

Sindrome di Wiskott Aldrich

Coordinator: Alessandro Aiuti

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16B02



**Disease Name:**

Wiskott Aldrich Syndrome

**Keywords:**

Hematopoietic Stem/Progenitor Cells, Gene Therapy, Clonal Tracking

## Poster P.20.141

### SAP AND DIACYLGLYCEROL KINASE A RECIPROCALLY REGULATE TCR SIGNALLING

Velmati S.<sup>[3]</sup>, Malacarne V.<sup>[1]</sup>, Ruffo E.<sup>[2]</sup>, Mauro C.<sup>[2]</sup>, Massarotti A.<sup>[3]</sup>, Tron G.<sup>[3]</sup>, Baldanzi G.<sup>[3]</sup>, Graziani A.<sup>\*[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università di Torino ~ Torino ~ Italy, <sup>[2]</sup>Università Vita-Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università del Piemonte Orientale ~ Novara ~ Italy

X-linked lymphoproliferative disease (XLP-1) is a primary immunodeficiency associated with excessive CD8+ T cell expansion following EBV infection. It is caused by LOF mutations in SH2D1A gene encoding SLAM-associated protein (SAP), an SH2-containing adaptor protein interacting with ITSM sequence of SLAM receptors. In absence of SAP, SLAM receptors act as negative regulator of TCR signalling, thus causing multiple immune defects including reduced TCR signaling and Restimulation-Induced Cell Death (RICD). The latter physiologically constrains antigen-activated T cell expansion during immune response and depends on TCR signalling strength.

We previously showed that upon TCR activation, SAP mediates the inhibition of diacylglycerol kinase alpha (DGK $\alpha$ ), a negative regulator of TCR signalling, which metabolizes diacylglycerol (DAG) to phosphatidic acid (PA) (Baldanzi, 2011). Thus, in SAP absence, deregulated DGK $\alpha$  activity impairs TCR signalling by consuming DAG, a key signalling lipid for immune synapse formation and activation of PKC- $\zeta$  and Ras-GRP. Accordingly, potentiation of TCR-induced signaling by DGK $\alpha$  knockdown or inhibition rescues RICD in vitro and in vivo by stimulating PKC $\theta$ , ERK1/2 and RSK activities (Ruffo, 2016). These findings underscore the relevance of DGK $\alpha$  as a key negative regulator of TCR signaling strength and a therapeutic target to restore RICD sensitivity in XLP-1 patients.

Furthermore, our findings showing the role of DGK $\alpha$  as negative regulator of TCR signaling downstream of SAP, have been further supported by recent data indicating DGKA as negative regulator of T cell response to the antigen, and reporting DGKA deregulation as one of mechanisms sustaining tumor-induced immune escape.

Nevertheless, the molecular mechanisms underlying the regulation of DGK $\alpha$  activity and the mechanisms by which it negatively regulates T cells, still remain to be elucidated.

Thus, the goals of this project have included:

- i) To develop novel DGK $\alpha$  specific inhibitors suitable for human use, through a virtual screening strategy. Indeed through this strategy we have developed a novel inhibitor and identified a common pharmacophoric structure for DGK $\alpha$  inhibitors (Velmati et al. 2019; Velmati et al. in press).
  - ii) to identify the molecular mechanisms regulating DGK $\alpha$ , to explore whether knock down of SAP interactors affects RICD and whether DGK $\alpha$  inhibition rescues the defective RICD. Indeed we will present data showing that knock down of a SAP interactor impairs RICD, which is rescued by DGK $\alpha$  knock down.
  - iii) to explore the mechanisms by which inhibition of based on our previous work showing that DGK $\alpha$  regulates integrin internalization and recycling (Rainero, 2012; Malacarne et al. ms. in preparation).
- Altogether these data suggest the hypothesis that DGK $\alpha$  acts in a pathway along with a SAP-containing protein complex, which reciprocally regulate a pathway controlling the strength of TCR signaling.

La sindrome di Duncan (XLP1) è una immunodeficienza primaria associata a espansione di linfociti T attivati in seguito a infezione con virus di Epstein-Barr e legata a un difetto di morte cellulare indotta

da stimolazione persistente del TCR (RICD). XLP1 è causata da mutazioni perdita di funzione del gene SH2D1A, codificante SAP, una proteina adattatrice, che regola la segnalazione del recettore dei linfociti T (TCR). Diacilglicerolo cinasi alfa (DGKa) è un regolatore negativo dell'attivazione linfocitaria, che rimuove il diacilglicerolo, un mediatore lipidico dell'attivazione linfocitaria. Precedentemente avevamo dimostrato che DGKa è inibita in seguito a attivazione dei linfociti T mediante un meccanismo che coinvolge SAP (Baldanzi, 2011). Pertanto, in linfociti T privi di SAP, l'attività DGKa è sempre accesa, mantenendo inattivi i linfociti pur in presenza dell'antigene. In queste cellule, l'inibizione della funzione di DGKa ristabilisce RICD. Infine, in un modello murino della patologia, l'inibizione di DGKA riduce la condizione iper-infiammatoria che caratterizza la sindrome (Ruffo, 2016). Queste osservazioni sottolineano la rilevanza di DGKa come bersaglio terapeutico per ripristinare la sensibilità dei linfociti T privi di SAP alla attivazione da parte degli antigeni. Per sfruttare questa opportunità terapeutica, stiamo sviluppando nuovi specifici inibitori adatti per uso umano (Velnati et al., 2019)

Per comprendere i meccanismi molecolari mediante cui SAP regola DGKa e quindi l'attivazione linfocitaria, abbiamo sviluppato una strategia secondo due direzioni: i) verificare se anche alcune proteine associate in complesso con SAP contribuiscono a regolare la RICD, chiarendo quindi meglio il ruolo diretto di SAP; ii) sulla base del nostro lavoro precedente in cellule tumorali (Rainero et al. 2012), abbiamo inteso esplorare se SAP e DGKa regolano la presenza alla superficie della cellula di alcune proteine chiave nel regolare l'attivazione linfocitaria.

Complessivamente questi dati suggeriscono l'ipotesi che SAP, insieme a alcune proteine con cui interagisce, e DGKa regolano in modo reciproco il citoscheletro dei linfociti, contribuendo quindi a determinare la presenza alla superficie cellulare di proteine chiave per la sensibilità all'attivazione linfocitaria

BALDANZI, G. et al. SAP-mediated inhibition of diacylglycerol kinase  $\alpha$  regulates TCR-induced diacylglycerol signaling. *J Immunol*, v. 187, n. 11, p. 5941-51, Dec 2011. ISSN 1550-6606.

RAINERO, E et al. Diacylglycerol kinase  $\alpha$  controls RCP-dependent integrin trafficking to promote invasive migration. *J Cell Biol.* v. 196:277-95 Dec. 2012, doi: 10.1083/jcb.201109112

RUFFO, E. et al. Inhibition of diacylglycerol kinase  $\alpha$  restores restimulation-induced cell death and reduces immunopathology in XLP-1. *Sci Transl Med*, v. 8, n. 321, p. 321ra7, Jan 2016. ISSN 1946-6242.

SNOW, A. L. et al. Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest*, v. 119, n. 10, p. 2976-89, Oct 2009.

VELNATI, S. et al. Identification of a novel DGK $\alpha$  inhibitor for XLP-1 therapy by virtual screening. *Eur J Med Chem*, v. 164, p. 378-390, Feb 2019.

XLP-1 (Sindrome di Duncan)

Coordinator: Andrea Graziani

Partner: Gianluca Baldanzi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GGP16252

**Disease Name:**

XLP-1 (Duncan Syndrome)

**Keywords:**

T cell receptor, Lipid Signaling, Diacylglycerol

## 21\_Genetic renal disease

## Poster P.21.142

### MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENESIS AND PRECLINICAL TREATMENT IN RENAL DISORDERS ASSOCIATED WITH UROMODULIN MUTATIONS

Schaeffer C.<sup>[1]</sup>, Cratere M.<sup>[1]</sup>, Trudu M.<sup>[1]</sup>, Tammaro C.<sup>[1]</sup>, Riba M.<sup>[2]</sup>, Pasqualetto E.<sup>[1]</sup>, Lazarevic D.<sup>[2]</sup>, Scolari F.<sup>[3]</sup>, Rampoldi L.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Molecular Genetics of Renal Disorders, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Center for Translational Genomics and Bioinformatics, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Division of Nephrology, Hospital of Montichiari ~ Montichiari ~ Italy

Uromodulin is the most abundant protein in urine and is specifically produced and released by epithelial cells lining the thick ascending limb of Henle's loop (TAL) of kidney nephrons (1). It plays a role in the protection against urinary tract infections and kidney stones, modulation of renal ion transport and innate immunity. Mutations in the uromodulin gene UMOD are responsible for Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease (ADTKD-UMOD), characterized by tubulointerstitial nephritis, hyperuricemia and gout, and progressive chronic kidney disease. Currently, there is no specific treatment other than renal replacement therapy. We demonstrated that UMOD mutations have a detrimental effect on protein trafficking and lead to retention of mutant uromodulin in the endoplasmic reticulum (ER). Accumulation of mutant uromodulin in expanded ER cisternae has indeed been observed in cell models of uromodulin expression, in a mouse model of ADTKD-UMOD (TgUmodC147W), and in patient kidney biopsy. We also demonstrated that mutant uromodulin partly escapes the ER quality control and forms aggregates in the tubular lumen, suggesting that uromodulin mutations have intracellular and possibly extracellular gain-of-toxic function effect.

The goal of our project was to deepen our understanding of the molecular mechanisms of disease pathogenesis and to identify potential therapeutic strategies. Studies in cell models demonstrated that mutant uromodulin is partly degraded by the proteasome and identified several chaperones as interactors that may play a role in mutant protein handling and degradation (2). By studying a panel of over 30 mutations we also observed that they can be clearly stratified into four classes on the bases of the extent of protein trafficking defect, suggesting genotype-phenotype correlation. RNA profiling of cells and mouse kidneys showed that mutant uromodulin expression induces ER stress pathways and signs of altered protein homeostasis (2,3). By generating transcriptional profiles in TgUmodC147W mice at different time points, we identified early activation of pathways related to inflammation and fibrosis as a key hallmark in the disease onset and progression. We indeed discovered pro-inflammatory signatures that are already present in the kidneys of TgUmodC147W mice soon after birth, well before the presence of any histological sign of renal damage and fibrosis. To understand if these and additional signals originate from cells expressing mutant uromodulin, likely downstream of ER stress, we generated a novel reporter mouse, expressing EGFP under the control of the Umod promoter. This model allows isolation of epithelial TAL cells from new-born mouse kidneys via fluorescence-activated cell sorting that will be instrumental for their characterisation. Early cellular pathogenetic pathways will represent ideal targets for innovative therapeutic strategies for ADTKD-UMOD and possibly for other renal or conformational diseases.

MECCANISMI MOLECOLARI DI PATOGENESI E TRATTAMENTO IN MODELLO PRECLINICO DELLA MALATTIA RENALE ASSOCIATA A MUTAZIONI DI UROMODULINA.

L'uromodulina è la proteina più abbondante nelle urine ed è prodotta unicamente nei nefroni renali

dalle cellule tubulari epiteliali del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle. Il suo ruolo non è ancora chiaro, sebbene si pensi che sia importante per la protezione dalle infezioni delle vie urinarie e dai calcoli, per l'assorbimento tubulare di sodio e per l'immunità innata renale. Mutazioni del gene UMOD che codifica per uromodulina causano la malattia renale tubulointerstiziale autosomica dominante associata ad uromodulina (ADTKD-UMOD) caratterizzata da nefrite tubulointerstiziale, iperuricemia e gotta, e insufficienza renale cronica. Non ci sono ad oggi terapie specifiche per ADTKD-UMOD, se non dialisi o trapianto renale.

Abbiamo in precedenza dimostrato che le mutazioni di UMOD portano ad un difetto del trasporto intracellulare e ritenzione nel reticolo endoplasmatico (ER) di uromodulina mutata. L'accumulo di uromodulina mutata nell'ER è infatti evidente in modelli cellulari, in un modello murino di ADTKD-UMOD, ovvero topi transgenici che esprimono uromodulina mutata (TgUmodC147W), e nelle biopsie renali di pazienti. Abbiamo inoltre dimostrato che parte della proteina mutata sfugge ai meccanismi di controllo cellulari e raggiungere la membrana plasmatica, dove tende a formare grossi aggregati proteici. Complessivamente i nostri dati dimostrano un chiaro effetto "guadagno di funzione" delle mutazioni di uromodulina.

Il nostro progetto di ricerca ha lo scopo di chiarire i meccanismi molecolari di patogenesi della malattia e di identificare e validare possibili terapie.

Nei modelli cellulari e nei topi TgUmodC147W la ritenzione della proteina mutata induce pathway di stress dell'ER e alterazione dell'omeostasi proteica. Ciò è associato ad una precoce induzione di alcuni segnali pro-infiammatori nei reni dei topi TgUmodC147W già ad un giorno di età, ben prima che ci siano segni istologici di danno renale. Partendo da questi risultati stiamo lavorando per capire quali siano i meccanismi di risposta cellulare indotti dall'accumulo di uromodulina mutata e come questi possano portare all'induzione del processo infiammatorio. Per questo scopo abbiamo generato un nuovo modello murino esprime la proteina fluorescente GFP sotto il controllo di promotore di uromodulina. Questo modello consente l'isolamento specifico delle cellule che esprimono uromodulina e sarà utilizzato per la loro caratterizzazione. Capire i segnali molecolari che giocano un ruolo chiave nell'insorgenza della malattia può rappresentare un passo importante verso l'identificazione di una cura per ADTKD-UMOD che potrebbe avere una ricaduta più ampia per altre malattie renali o da accumulo proteico.

1. Devuyst O, Olinger E, Rampoldi L (2017) Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat Rev Nephrol.* 13(9):525-544. PMID:28781372
2. Schaeffer C, Merella S, Pasqualetto E, Lazarevic D, Rampoldi L (2017) Mutant uromodulin expression leads to altered homeostasis of the endoplasmic reticulum and activates the unfolded protein response. *PLoS One* 12(4):e0175970. PMID:28437467
3. Trudu M, Schaeffer C, Riba M, Ikehata M, Brambilla P, Messa P, Martinelli-Boneschi F, Rastaldi MP, Rampoldi L (2017) Early involvement of cellular stress and inflammatory signals in the pathogenesis of tubulointerstitial kidney disease due to UMOD mutations. *Sci Rep.* 7(1):7383. PMID:28785050

Malattia Renale Tubulointerstiziale Autosomica Dominante

Coordinator: Luca Rampoldi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14263

**Disease Name:**

Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease

**Keywords:**

Uromodulin, Tamm-Horsfall Glycoprotein-Horsfall, Hereditary Nephritis



## 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

## Poster P.21.144

### DECODING AND TARGETING THE MTORC1-TFEB AXIS IN GENETIC DISEASES

Di Malta C., Napolitano G., Esposito A., Benedetti V., Zampelli A., Matarese M., Vilardo C., Ballabio A.\*

*TIGEM-TELETHON ~ POZZUOLI (NA) ~ Italy*

Transcription factor EB (TFEB), as well as the other members of the MiT-TFE family of transcription factors, are master regulators of cellular catabolic pathways, including autophagy and lysosomal biogenesis. Induction of TFEB activity has been successfully used as a therapeutic strategy in several disease models characterized by autophagy/lysosomal dysfunction or by accumulation of toxic aggregates, including lysosomal storage disorders and neurodegenerative diseases. However, chronic TFEB activity has been associated to carcinogenesis, suggesting that a tight control of TFEB activity is required for its use as therapeutic tool.

The subcellular localization and activity of TFEB are controlled by its phosphorylation status, which is mainly modulated by mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), a key kinase complex that plays a crucial role in the adaptation of cell metabolism to environmental cues: in the presence of nutrients, mTOR phosphorylates TFEB on specific serine residues, which keeps TFEB cytosolic and inactive. Upon starvation, mTOR inactivation and the concomitant activation of the phosphatase calcineurin induce TFEB de-phosphorylation and activation of its target genes. Recent data obtained in our laboratory revealed that mTOR-mediated phosphorylation of MiT-TFE factors is highly dependent on the activity of RagGTPases, crucial modulators of mTORC1, and on their physical interaction with MiT-TFE proteins. Notably, de-regulation of this pathway leads to chronic TFEB activity and is implicated in the pathogenesis of human genetic diseases, such as the Birt-Hogg-Dubé (BHD) syndrome, in which affected individuals are at risk of developing benign cutaneous fibrofolliculomas, bilateral pulmonary cysts, spontaneous pneumothoraces and kidney cancer. Our study identifies the mTORC1-TFEB axis as a key therapeutic target for this disorder. Thus, the discovery of new drugs able to either induce or inhibit this pathway would be extremely valuable as an alternative therapeutic approach for different types of disorders, including neurodegenerative diseases and LSDs or BHD syndrome and cancer, respectively.

Decodifica e targeting dell'asse mTORC1-TFEB nelle malattie genetiche

Il fattore di trascrizione EB (TFEB), così come gli altri membri della famiglia di fattori di trascrizione MiT-TFE, sono i regolatori principali delle vie cataboliche cellulari, tra cui l'autofagia e la biogenesi lisosomiale. L'induzione dell'attività di TFEB è stata utilizzata con successo come strategia terapeutica in diversi modelli patologici caratterizzati da disfunzione autofagica / lisosomiale o dall'accumulo di aggregati tossici, inclusi disturbi da accumulo lisosomiale e malattie neurodegenerative. Tuttavia, l'attività cronica del TFEB è stata associata alla carcinogenesi, suggerendo che per il suo uso come strumento terapeutico è necessario un rigoroso controllo della stessa.

La localizzazione subcellulare e l'attività di TFEB sono controllate dal suo stato di fosforilazione, che è modulato principalmente dal complesso chinasi sensibile alla rapamicina (mTORC1), un complesso proteico che svolge un ruolo cruciale nell'adattamento del metabolismo cellulare ai segnali ambientali: in presenza di nutrienti, mTOR fosforila TFEB su specifici residui di serina, che mantengono il TFEB citosolico e inattivo. In caso di carenza di nutrienti, l'inattivazione di mTOR e l'attivazione concomitante della fosfatasi calcineurina inducono la defosforilazione di TFEB e l'attivazione dei suoi geni bersaglio.

Dati recenti ottenuti nel nostro laboratorio hanno rivelato che la fosforilazione mediata da mTOR dei fattori MiT-TFE è fortemente dipendente dall'attività di RagGTPasi, modulatori cruciali di mTORC1 e dalla loro interazione fisica con le proteine MiT-TFE. In particolare, la deregolazione di questo asse porta all'attività cronica di TFEB ed è implicata nella patogenesi delle malattie genetiche umane, come la sindrome di Birt-Hogg-Dubé (BHD), in cui le persone colpite sono a rischio di sviluppare fibrofollicolomi cutanei benigni, cisti polmonari bilaterali, pneumotorace spontaneo e carcinoma renale. Il nostro studio identifica l'asse mTORC1-TFEB come obiettivo terapeutico chiave per questo disturbo. Pertanto, la scoperta di nuovi farmaci in grado di indurre o inibire questo percorso sarebbe estremamente preziosa come approccio terapeutico alternativo per diversi tipi di malattie genetiche, tra cui malattie neurodegenerative e LSD o sindrome di BHD e cancro.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30120233>

mTOR-dependent phosphorylation controls TFEB nuclear export.

Napolitano G, Esposito A, Choi H, Matarese M, Benedetti V, Di Malta C, Monfregola J, Medina DL, Lippincott-Schwartz J, Ballabio A. Nat Commun. 2018 Aug 17;9(1):3312. doi: 10.1038/s41467-018-05862-6. PMID:30120233

Molecular genetics and clinical features of Birt-Hogg-Dubé syndrome.

Schmidt LS, Linehan WM.

Nat Rev Urol. 2015 Oct;12(10):558-69. doi: 10.1038/nrurol.2015.206. Epub 2015 Sep 1. Review.

PMID:26334087

Malattie Genetiche, Sindrome di Birt-Hogg-Dubé (BHD)

Coordinator: Andrea Ballabio

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Genetic Diseases, Birt-Hogg-Dubé (BHD) Syndrome

**Keywords:**

TFEB, mTORC1, genetic diseases

## 22\_Genetic respiratory disease

## Poster P.22.145

### COMPUTATIONAL AND QUANTITATIVE BIOLOGY IN RARE GENETIC DISEASES.

Di Bernardo D.\*

*TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy*

The possibility of quantitatively measuring gene, protein and metabolite levels in a cell population and more recently in individual cells represents a unique opportunity to gain insight into disease mechanisms in order to identify potential therapeutic approaches. In our lab, we are leveraging state-of-the-art experimental approaches based on microfluidics and next-generation sequencing with novel computational approaches based on computer science and engineering to aid the study of rare genetic disorders including lysosomal storage disorders, cystic fibrosis (CF) and polycystic kidney disease (PKD). In the field of lysosomal storage disorders, we focused on the transcription factor E Box (TFEB) involved in the regulation of lysosomal biogenesis. We are building quantitative models of the dynamics of TFEB nuclear accumulation in single cells in response to a diverse range of perturbations (e.g. stress stimuli and small molecules) by means of a microfluidics device enabling dynamic control of the microenvironment in which cells are growing, coupled to microscopy to follow in real time TFEB shuttling dynamics. The goal is to verify whether different dynamics are elicited by different stimuli, what the functional relevance of TFEB dynamics is, and which are the molecular mechanisms behind the observed dynamics. Ultimately, we expect that this project will lead to the identification of novel pathways involved in TFEB regulation and a comprehensive understanding of how different stress stimuli regulate TFEB activity. With respect to cystic fibrosis, we set-up an in-house technology based on droplet generation via microfluidics to measure transcriptional profiles in single cells and applied it to characterise airway epithelial cell cultures of CF patients (in partnership with Luis Galletta at TIGEM) with the aim to identify cell type specific expression of ion channels and assess the changes in cell-type composition in disease. With respect to PKD, in partnership with Alessandra Boletta at San Raffaele, we recently introduced a novel computational approach to simulate in silico kidney metabolism in response to different challenges including gene knock-outs and overexpression, and applied it to dissect the metabolic reprogramming occurring in PKD.

La possibilità di misurare quantitativamente i livelli di geni, proteine e metaboliti in una popolazione cellulare e più recentemente nelle singole cellule rappresenta un'opportunità unica per ottenere informazioni sui meccanismi della malattia al fine di identificare potenziali approcci terapeutici. Nel nostro laboratorio, stiamo sfruttando approcci sperimentali all'avanguardia basati sulla microfluidica e sul sequenziamento di prossima generazione con nuovi approcci computazionali basati su informatica e ingegneria applicate allo studio di malattie genetiche rare tra cui disturbi da accumulo lisosomiale, fibrosi cistica (CF) e malattia renale policistica (PKD). Nel campo dei disturbi da accumulo lisosomiale, ci siamo concentrati sul fattore di trascrizione E Box (TFEB) coinvolto nella regolazione della biogenesi lisosomiale. Stiamo costruendo modelli quantitativi della dinamica dell'accumulo nucleare di TFEB in singole cellule in risposta a una vasta gamma di perturbazioni (ad es. Stimoli da stress e piccole molecole) mediante un dispositivo di microfluidica che consente il controllo dinamico del microambiente in cui le cellule crescono, accoppiate alla microscopia per seguire in tempo reale le dinamiche di shuttling del TFEB. L'obiettivo è verificare la rilevanza funzionale delle cinetiche di TFEB in risposta a stimoli diversi, e quali sono i meccanismi molecolari alla base delle cinetiche osservate. In definitiva, prevediamo che questo progetto porterà all'identificazione di nuovi pathway coinvolti nella

regolazione di TFEB e ad una comprensione dettagliata della sua regolazione. Per quanto riguarda la fibrosi cistica, abbiamo implementato una tecnologia microfluidica per misurare i profili trascrizionali in singole cellule per caratterizzare le colture di cellule epiteliali delle vie aeree dei pazienti con CF (in collaborazione con Luis Galiotta presso il TIGEM) con lo scopo di identificare i diversi tipi cellulari e valutare i cambiamenti nella composizione del tessuto nella malattia. Per quanto riguarda il rene policistico, in collaborazione con Alessandra Boletta del San Raffaele di Milano, abbiamo applicato un approccio computazionale per simulare il metabolismo renale al computer in risposta a diverse perturbazioni tra cui knock-out genici e sovraespressione di geni al fine di comprendere la riprogrammazione metabolica che si verifica nella malattia.

gene2drug: a computational tool for pathway-based rational drug repositioning.

Napolitano F, Carrella D, Mandriani B, Pisonero-Vaquero S, Sirci F, Medina DL, Brunetti-Pierri N, di Bernardo D.

Bioinformatics. 2018 May 1;34(9):1498-1505. doi: 10.1093/bioinformatics/btx800.

The Autophagy Inhibitor Spautin-1 Antagonizes Rescue of Mutant CFTR Through an Autophagy-Independent and USP13-Mediated Mechanism.

Pesce E, Sondo E, Ferrera L, Tomati V, Caci E, Scudieri P, Musante I, Renda M, Baatallah N, Servel N, Hinzpeter A, di Bernardo D, Pedemonte N, Galiotta LJV.

Front Pharmacol. 2018 Dec 13;9:1464. doi: 10.3389/fphar.2018.01464. eCollection 2018.

Regulation of Gene Expression and Signaling Pathway Activity in Mammalian Cells by Automated Microfluidics Feedback Control.

Postiglione L, Napolitano S, Pedone E, Rocca DL, Aulicino F, Santorelli M, Tumaini B, Marucci L, di Bernardo D.

ACS Synth Biol. 2018 Nov 16;7(11):2558-2565. doi: 10.1021/acssynbio.8b00235. Epub 2018 Oct 22.

Dissection of metabolic reprogramming in polycystic kidney disease reveals coordinated rewiring of bioenergetic pathways.

Podrini C, Rowe I, Pagliarini R, Costa ASH, Chiaravalli M, Di Meo I, Kim H, Distefano G, Tiranti V, Qian F, di Bernardo D, Frezza C, Boletta A.

Commun Biol. 2018 Nov 16;1:194. doi: 10.1038/s42003-018-0200-x. eCollection 2018.

Fibrosi Cistica, Malattie da accumulo lisosomiale

Coordinator: Diego Di Bernardo

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Cystic Fibrosis, Lysosomal Storage Disorders

**Keywords:**

computational biology, microfluidics, systems biology



## 23\_Genetic skin disease

## Poster P.23.146

### A FUNCTIONAL GENOMICS FRAMEWORK TO INVESTIGATE THE MOLECULAR BASES OF RARE GENETIC DISEASES

Vaccaro L., Panariello F., Annunziata P., Dionisi M., Riccardo S., Grimaldi A., Bouche V., Manfredi A., Cacchiarelli D.\*

*TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy*

As of today, it is impossible to perform a population genetic association study (i.e. GWAS) for rare genetic diseases, due to the limited cohort of affected patients. The main goal of this project is to be able to predict the pathogenetic risk associated with any possible aminoacidic mutation of proteins acting as the main genetic lesion of rare monogenic diseases. To this end, we setup a novel approach to generate protein mutagenesis libraries (MiTE-seq) applied to a large-scale analysis of every possible mutation in the protein of interest.

We decided to use the gene TP63 as a proof-of-principle strategy, focusing on its SAM domain, known to be the hotspot for driving mutations of AEC syndrome. We built a lentiviral library with every possible missense mutation of TP63 SAM domain, for a total of ~1200 mutations. To test the biological effect of each TP63 protein variant, we optimized a fibroblast-to-keratinocyte conversion assay which leverages TP63 activity to perform the conversion.

We were able to separate three different populations: iKC (enriched in gain of function and silent mutations), non-converted cells (enriched in loss of function mutations) and a halfway population (enriched in milder loss of function mutations). This allowed scoring the severity of existing and novel variants in the general population. Super-imposing the activity of the variants on the TP63 protein structure will also provide hints to understand the unknown role of TP63 SAM domain.

We are also expanding this approach to additional disease-driving genes to better dissect the relationship between genotype and phenotype in genes involved in rare genetic diseases.

Ad oggi è impossibile effettuare uno studio di associazione genetica della popolazione (es. GWAS) per malattie genetiche rare, a causa della limitata coorte di pazienti affetti. L'obiettivo principale di questo progetto è quello di essere in grado di prevedere il rischio patogenetico associato ad ogni possibile mutazione aminoacidica delle proteine che agiscono come principale lesione genetica di malattie monogeniche rare. A tal fine, abbiamo messo a punto un nuovo approccio per generare librerie di mutagenesi proteica (MiTE-seq) applicate ad un'analisi su larga scala di ogni possibile mutazione della proteina di interesse.

Abbiamo deciso di utilizzare il gene TP63 come strategia di proof-of-principle, concentrandoci sul suo dominio SAM, noto per essere l'hotspot per guidare le mutazioni della sindrome AEC. Abbiamo costruito una libreria lentivirale con ogni possibile mutazione missenso del dominio TP63 SAM, per un totale di ~1200 mutazioni. Per verificare l'effetto biologico di ogni variante della proteina TP63, abbiamo ottimizzato un test di conversione da fibroblasti a cheratinociti che sfrutta l'attività di TP63 per eseguire la conversione.

Siamo stati in grado di separare tre diverse popolazioni: iKC (arricchito in mutazioni di guadagno di funzione e mutazioni silenti), cellule non convertite (arricchite in mutazioni con perdita di funzione) e una popolazione a metà strada (arricchita in perdita più lieve di funzione). Questo ha permesso di valutare la gravità delle varianti esistenti e di quelle nuove nella popolazione generale. La

sovrapposizione dell'attività delle varianti sulla struttura della proteina TP63 fornirà anche spunti per comprendere il ruolo sconosciuto del dominio SAM di TP63.

Stiamo anche ampliando questo approccio ad altri geni patogeni per dissezionare meglio la relazione tra genotipo e fenotipo nei geni coinvolti in malattie genetiche rare.

...

Sindrome di Hay-Wells

Coordinator: Davide Cacchiarelli

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

TIGEM STARTUP GRANT

**Disease Name:**

AEC Syndrome or Hay-Wells Syndrome

**Keywords:**

Functional Genomics, High Throughput Protein Mutagenesis, TP63

## Poster P.23.147

### THERAPEUTIC STRATEGIES TO RESCUE SKIN EROSIONS IN AEC SYNDROME.

Sol S., Urciuoli G., Russo C., Antonini D., Missero C.\*

*CEINGE ~ Napoli ~ Italy*

AEC syndrome is an autosomal dominant disorder characterized by severe and long-lasting skin erosions that develop postnatally and for which there is no effective treatment. The disorder is caused by mutations in the p63 gene encoding a master regulator of epidermal commitment and differentiation.

Using a recently developed conditional mouse model and patient-derived epidermal cells, we have shown that mutations in p63 cause reduced expression of bona fide p63 target genes, including hemidesmosome and desmosome components, leading to reduced cell-matrix and cell-cell adhesion. In addition, the intrinsic mechanical resistance of basal epidermal cells is weakened by reduced expression of basal keratins. Finally, epidermal hypoplasia and delayed wound healing is associated with reduced number of progenitor cells due to defective Fibroblast Growth Factor signaling.

AEC syndrome causative mutations fall in the poorly characterized C-terminal domain of the p63 $\alpha$  isoform. We discovered that AEC syndrome is a protein aggregation disorder as AEC-associated p63 mutations lead to thermodynamic protein destabilization, misfolding and accumulation of high molecular weight protein aggregates in the nucleus. Variants that abolish aggregation of the mutant p63 proteins are able to rescue p63's transcriptional function, thus opening a window of therapeutic opportunities. Screening of a chaperone library is ongoing to identify members of the chaperone family that may be able to specifically disaggregate and/or prevent aggregation of mutant p63. In addition we are also screening a library of small compounds already approved for clinical use for the ability of recovering p63 activity in a heterozygous setting.

A third strategy that we are pursuing is to restore p63 functions in AEC syndrome, by replacing the p63 $\alpha$  with the p63 $\beta$  isoform by deleting/skipping a single exon. Our preliminary results indicate that such replacement leads to defective limb and palate development in the mouse, but surprisingly has no detrimental effects on mouse skin development or adult skin homeostasis, nor on human epidermal cell fate commitment, indicating that it may be a safe strategy for therapeutic intervention in postnatal skin.

La sindrome di Hay-Wells è una malattia autosomica dominante caratterizzata da erosioni cutanee gravi e di lunga durata che si sviluppano dopo la nascita e per le quali non esiste un trattamento efficace. Il disturbo è causato da mutazioni del gene p63 che codifica per un regolatore fondamentale della pelle.

Utilizzando un modello di topo condizionale recentemente sviluppato e cellule derivate da pazienti, abbiamo dimostrato che le mutazioni in p63 causano una ridotta espressione di alcuni geni bersaglio di p63 causando una riduzione dell'adesione cellulare e di cheratine, e quindi un indebolimento della struttura meccanica intrinseca della pelle.

Le mutazioni causali della sindrome di Hay-Wells ricadono nel dominio C-terminale scarsamente caratterizzato dell'isoforma della proteina p63 $\alpha$ . Abbiamo scoperto che la sindrome AEC è una patologia dovuta ad aggregazione proteica poiché le mutazioni p63 associate ad AEC portano alla destabilizzazione termodinamica di p63 e accumulo di aggregati proteici ad alto peso molecolare nel

nucleo. Abbiamo scoperto che varianti della proteina che aboliscono l'aggregazione delle proteine mutanti del p63 sono in grado di ripristinare la funzione trascrizionale di p63, aprendo così una finestra di opportunità terapeutiche.

È in corso lo screening di varie proteine che prevengono l'aggregazione o aiutano a disaggregare varie proteine cellulari per stabilire se sia possibile ripristinare le funzioni della proteina mutata o eliminarla in maniera specifica.

Una seconda strategia che stiamo perseguendo è quella di ripristinare le funzioni di p63 nella sindrome, sostituendo la p63 $\alpha$  con l'isoforma p63 $\beta$  eliminando un singolo esone. I nostri risultati preliminari indicano che tale sostituzione porta allo sviluppo di arto e palato difettosi, ma sorprendentemente non ha effetti dannosi sullo sviluppo della pelle del topo o sull'omeostasi della pelle dell'adulto, né su cellule epidermiche umane, indicando che potrebbe essere una strategia sicura per l'intervento terapeutico in pelle postnatale.

Ferone, G., Thomason, H., Antonini, D., De Rosa, L., Hu, B., Gemei, M., Zhou, H., Ambrosio, R., Rice, D., Acampora, D., van Bokhoven, H., Del Vecchio, L., Koster, M., Tadini, G., Spencer-Dene, B., Dixon, M., Dixon, J., Missero, C. (2012). Mutant p63 causes defective expansion of ectodermal progenitor cells and impaired FGF signaling in AEC syndrome. *EMBO Mol. Med.*, 4 (3) 192-205.

Ferone, G. Mollo, M.R., Thomason, H.A., Antonini, D., Zhou, H., Ambrosio, R., De Rosa, L., Salvatore, D., Getsios, S, van Bokhoven, H., Dixon, J., Missero, C. (2012). p63 control of desmosome gene expression and adhesion is compromised in AEC syndrome. *Hum. Mol. Gen.*, 22(3):531-43.

Ferone G, Mollo MR, Missero C. Epidermal cell junctions and their regulation by p63 in health and disease. *Cell & Tissue Research*. Accepted for publication Dec 22 2014.

Antonini D, Sirico A, Aberdam E, Ambrosio R, Campanile C, Fagoonee S, Altruda F, Aberdam D, Brissette JL, Missero C. A composite enhancer regulates p63 gene expression in epidermal morphogenesis and in keratinocyte differentiation by multiple mechanisms. *Nucleic Acid Res.* 2015 Jan;43(2):862-74. doi: 10.1093/nar/gku1396.

Ferone G, Mollo MR, Missero C. Epidermal cell junctions and their regulation by p63 in health and disease. *Cell Tissue Res.* 2015 Jun;360(3):513-28. doi: 10.1007/s00441-014-2108-1.

Richardson R, Mitchell K, Hammond NL, Mollo MR, Kouwenhoven EN, Wyatt ND, Donaldson IJ, Zeef L, Burgis T, Blance R, van Heeringen SJ, Stunnenberg HG, Zhou H, Missero C, Romano RA, Sinha S, Dixon MJ, Dixon J. p63 exerts spatio-temporal control of palatal epithelial cell fate to prevent cleft palate. *PLoS Genet.* 2017 13(6):e1006828. doi: 10.1371/journal.pgen.1006828.

Russo C, Osterburg C, Sirico A, Antonini D, Ambrosio R, Würz JM, Rinnenthal J, Ferniani M, Kehrloesser S, Schäfer B, Güntert P, Sinha S, Dötsch V, Missero C. Protein aggregation of the p63 transcription factor underlies severe skin fragility in AEC syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 115(5):E906-E915. doi 10.1073/pnas.1713773115.

Mollo MR, Cirillo L, Russo C, Antonini D, Missero C. Functional and Mechanistic Insights into the Pathogenesis of P63-Associated Disorders. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2018 Dec;19(2):S98-

S100. doi: 10.1016/j.jisp.2018.10.004.

Sindrome di Hay-Wells

Coordinator: Caterina Missero

Duration (N. Years): 3

Starting Year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16235

**Disease Name:**

AEC Syndrome or Hay-Wells Syndrome

**Keywords:**

Skin, exon skipping, protein aggregation

## Poster P.23.148

### A THERAPEUTIC APPROACH FOR RARE GENODERMATOSES CAUSED BY ABERRANT CONNEXIN HEMICHANNELS

Mammano F., Salvatore A.M.\*

*Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) ~ Roma (Monterotondo) e Napoli ~ Italy*

Mutations in connexin genes expressed in epidermal keratinocytes cause a variety of rare genodermatoses, ascribed to keratinocyte proliferation and/or differentiation defects, that range in severity from increases in skin thickness, to life-threatening and fatal barrier break down. In particular, some “leaky” or abnormally active hemichannels comprising pathological connexin 26 (Cx26) variants are causally linked to keratitis-ichthyosisdeafness (KID) syndrome (OMIM #148210), a devastating disease. For this and numerous other hemichannel-related pathologies, there is a compelling need to develop connexin-specific therapeutics. The availability of mouse models for this specific pathology combined with accessibility of epidermal connexins to pharmacological interference by both systemic and topical delivery, offer a significant opportunity to validate new drug candidates.

Antibodies are the most successful affinity tools used today, in both fundamental and applied research. The ability of antibodies to bind an antigen with a high degree of affinity and specificity is leading them to become the largest and fastest growing class of therapeutic proteins. Our published results indicate that submicromolar concentrations of a human-derived scFv-Fc antibody, named abEC1.1, selected from a combinatorial phage display library, inhibit aberrant Cx26 hemichannels.

The overall goal of this proposal is to determine the efficacy of systemic and topical administration of this antibody, and its variant with a mouse Fc, to mutant mice harboring Cx26 mutations that generate aberrant hemichannels responsible for KID syndrome. The knowledge gained with these studies (i) will have a critical translational impact for patients affected by currently incurable skin conditions and (ii) will help elucidating the mechanisms underlying the etiopathogenesis of KID syndrome and related diseases.

**TITOLO:** Un approccio terapeutico per genodermatosi rare causate da emicanali aberranti di connessine espressi nell'epidermide

**ABSTRACT:** Le mutazioni nei geni delle connessine espresse nei cheratinociti epidermici causano una varietà di genodermatosi rare, dovute a proliferazione dei cheratinociti e / o difetti di differenziamento, che variano in gravità da semplici aumenti di spessore della pelle fino a abbattimento della barriera protettiva fornita dalla pelle con rischio di morte. In particolare, alcuni canali di membrana formati da connessine, e noti come “emicanali”, risultano anormalmente attivi in relazione a varianti patologiche della connessina 26 (Cx26) che sono la causa della sindrome da sordità, cheratite eittiosi (KID, OMIM # 148210), una malattia devastante. Per questa come pure per numerose altre patologie legate a mutazioni degli emicanali di connessine, vi è un bisogno impellente di sviluppare terapie mirate. La disponibilità di modelli murini per questa patologia specifica combinata con l'accessibilità delle connessine epidermiche a terapie farmacologiche sia sistemiche che topiche offrono una valida opportunità per la ricerca di nuovi farmaci. Gli anticorpi monoclonali sono gli strumenti ad alta affinità e specificità di maggior successo sia nella ricerca fondamentali che nelle applicazioni mediche. La capacità degli anticorpi di legare un antigene con un alto grado di affinità e specificità li sta portando diventare la classe dominante di proteine terapeutiche in più rapida crescita.

I nostri risultati già pubblicati indicano che concentrazioni sub-micromolari di un anticorpo scFv-Fc di origine umana, denominato abEC1.1, selezionato da una libreria combinatoria di esposizione su fagi, inibisce gli aberranti che causano la sindrome KID. L'obiettivo generale di questo progetto è determinare l'efficacia dell'amministrazione sistemica e topica di questo anticorpo, nella sua variante murina, a topi che esprimono emicanali mutanti di Cx26 responsabili della sindrome KID. Le conoscenze acquisite con questi studi (1) avranno un impatto traslazionale critico per i pazienti affetti da malattie della pelle attualmente incurabili e (2) contribuiranno a chiarire i meccanismi alla base della sindrome KID e delle patologie ad essa correlate.

1. E. Lilly, C. Sellitto, L. M. Milstone, T. W. White, Connexin channels in congenital skin disorders. *Seminars in cell & developmental biology* 50, 4-12 (2016).
2. M. A. Retamal, E. P. Reyes, I. E. Garcia, B. Pinto, A. D. Martinez, C. Gonzalez, Diseases associated with leaky hemichannels. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 267 (2015).
3. L. Xu, A. Carrer, F. Zonta, Z. Qu, P. Ma, S. Li, F. Ceriani, D. Buratto, G. Crispino, V. Zorzi, G. Ziraldo, F. Bruno, C. Nardin, C. Peres, F. Mazzarda, A. M. Salvatore, M. Raspa, F. Scavizzi, Y. Chu, S. Xie, X. Yang, J. Liao, X. Liu, W. Wang, S. Wang, G. Yang, R. A. Lerner, F. Mammano, Design and Characterization of a Human Monoclonal Antibody that Modulates Mutant Connexin 26 Hemichannels Implicated in Deafness and Skin Disorders. *Frontiers in molecular neuroscience* 10, 298 (2017).
4. G. Ziraldo, D. Buratto, Y. Kuang, L. Xu, A. Carrer, C. Nardin, F. Chiani, A. M. Salvatore, G. Paludetti, R. A. Lerner, G. Yang, F. Zonta, F. Mammano, A Human-Derived Monoclonal Antibody Targeting Extracellular Connexin Domain Selectively Modulates Hemichannel Function. *Frontiers in physiology* 10, 392 (2019).

Sindrome da cheratite, ittiosi e sordità (KID)

Coordinator: Fabio Mammano

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2019

**Telethon Project (nr):**

GGP19148

**Disease Name:**

Keratitis-Ichthyosisdeafness (KID) Syndrome

**Keywords:**

CONNEXIN 26, GENODERMATOSIS, THERAPEUTIC ANTIBODY



## 24\_Genetic systemic or rheumatologic disease

## Poster P.24.149

### NEW PHARMACOLOGICAL TARGETS AND STRATEGIES IN AGEL AMYLOIDOSIS

Diomedede L.<sup>[1]</sup>, Giorgino T.<sup>[2]</sup>, Mastrangelo E.<sup>[2]</sup>, Barbiroli A.<sup>[3]</sup>, Milani M.<sup>[2]</sup>, De Rosa M.\*<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Department of Molecular Biochemistry and Pharmacology, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>DeFens, Università degli studi di Milano ~ Milano ~ Italy

Agel amyloidosis is a rare degenerative disease caused by the pathological deposition of mutated gelsolin. Its systemic variants, identified in the '70s, have been thoroughly characterized (reviewed in [1]) but six novel pathological mutants have been described in the last five years [2-7]. The disease mechanism promoted by these forms has been only partially characterized [8,9]. Moreover, no pharmacological therapy is available for any form of AGel. The amyloidogenic pathway underlying the better described variants is a multistep process, characterized by protein conformational changes and aberrant proteolytic events. We recently started to explore different strategies to block or at least slow down gelsolin aggregation and identified molecular species that can be targeted by small molecules:

i) gelsolin undergoes large conformational changes, necessary for its physiological activity. We demonstrated that only the open/active form is susceptible to aberrant proteolysis. Therefore, molecules able to lock the protein in the closed conformation have the potential to inhibit the amyloidogenic process. The molecules we tested so far are analogues of inositol tetrakisphosphate, we are planning to screen for molecules which maintain this inhibitory capacity but that lack other biological activities.

ii) all the mutations so far characterized lead to a destabilization of the second domain of the protein, increase its conformational flexibility and its susceptibility to proteolysis. We described the mechanism of action of a, previously developed, nanobody [10]. Such nanobody stabilizes the fold of the mutated domain to WT-like levels, preventing its degradation. This kind of molecules are known as chemical chaperones and have been already successfully developed for other amyloidoses. Based on the structure of the gelsolin-nanobody complex we are designing peptides able to chaperone the mutated protein.

iii) Once the amyloidogenic fragments are produced by the two proteolytic events, they readily aggregate. We already shown that well known anti-aggregation compounds, such as tetracyclines, counter gelsolin proteotoxicity in a *C. elegans*-based assay. We plan to better characterize the mechanism of action of these compounds and screen for more potent inhibitors of gelsolin aggregation.

Nuove strategie e bersagli farmacologici contro l'amiloidosi da gelsolina.

Le proteine sono lunghi polimeri lineari che si ripiegano ad assumere una determinata struttura tridimensionale. Quando la struttura non è corretta le proteine possono essere tossiche e dare origine a patologie note come malattie da conformazione. Le amiloidosi appartengono a questa ampia classe di disturbi e sono caratterizzate da depositi di aggregati proteici fibrosi in varie parti dell'organismo. L'amiloidosi da gelsolina, in particolare, è una malattia genetica rara, causata da mutazioni nel gene della gelsolina. Benché nota dagli anni 70, 6 nuove forme della malattia sono state descritte negli ultimi 5 anni. I meccanismi molecolari alla base di queste forme sono stati solo parzialmente descritti. Le forme della malattia note da più tempo, che sono anche le più frequenti, sono state invece

abbondantemente caratterizzate e gli eventi molecolari che portano all'aggregazione della proteina sono noti: la proteina, inizialmente nella sua forma completa e strutturata, subisce cambi conformazionali e degradazioni che portano alla formazione di corti frammenti della stessa che aggregano e si depositano in vari organi. Ultimamente, ci siamo interrogati su quali di questi eventi potessero essere bersaglio di nuove potenziali terapie farmacologiche. Siamo riusciti a dimostrare che tre diversi eventi del meccanismo patologico possono essere utilizzati come bersaglio: i) l'attivazione fisiologica della proteina che coincide con un importante cambio conformazionale. ii) La stabilizzazione della porzione mutata della proteina, che previene la sua degradazione. iii) L'utilizzo di composti che prevengono l'aggregazione dei frammenti di gelsolina. Benché queste strategie siano discretamente validate i composti utilizzati in queste prime prove non possono essere utilizzati come farmaci. Sono infatti molecole con altre attività biologiche, il cui utilizzo provocherebbe gravi effetti collaterali. E' quindi ora necessario identificare e caratterizzare nuove molecole che mantengano le proprietà di quelle già testate ma con maggiore specificità per il nostro bersaglio. A questo scopo, impieghiamo tecniche che permettono la visualizzazione delle proteine ad un livello di dettaglio "atomico". Inoltre integriamo i dati strutturali con altri dati, prodotti da esperimenti al computer (in silico), in provetta (in vitro) o utilizzando un piccolo invertebrato, il *C. elegans*, come organismo modello (in vivo).

- [1] Solomon JP, Page LJ, Balch WE, Kelly JW. Gelsolin amyloidosis: genetics, biochemistry, pathology and possible strategies for therapeutic intervention. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012;47: 282–296.
- [2] Sethi S, Theis JD, Quint P, Maierhofer W, Kurtin PJ, Dogan A, et al. Renal amyloidosis associated with a novel sequence variant of gelsolin. *Am J Kidney Dis.* 2013;61: 161–166.
- [3] Efebera YA, Sturm A, Baack EC, Hofmeister CC, Satoskar A, Nadasdy T, et al. Novel gelsolin variant as the cause of nephrotic syndrome and renal amyloidosis in a large kindred. *Amyloid.* 2014;21: 110–112.
- [4] Feng X, Zhu H, Zhao T, Hou Y, Liu J. A new heterozygous G duplicate in exon1 (c.100dupG) of gelsolin gene causes Finnish gelsolin amyloidosis in a Chinese family. *Brain Behav.* 2018;8: e01151.
- [5] Sridharan M, Highsmith WE, Kurtin PJ, Zimmermann MT, Theis JD, Dasari S, et al. A Patient With Hereditary ATTR and a Novel AGel p.Ala578Pro Amyloidosis. *Mayo Clin Proc.* 2018;93: 1678–1682.
- [6] Oregel KZ, Shouse GP, Oster C, Martinez F, Wang J, Rosenzweig M, et al. Atypical Presentation of Gelsolin Amyloidosis in a Man of African Descent with a Novel Mutation in the Gelsolin Gene. *Am J Case Rep.* 2018;19: 374–381.
- [7] Gavinda S, Anthony B, Michael D, Cerys E, Alison H, Kevin T. 276 A new face for an old foe? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018;89: A40.3–A40.
- [8] Boni F, Milani M, Porcari R, Barbiroli A, Ricagno S, de Rosa M. Molecular basis of a novel renal amyloidosis due to N184K gelsolin variant. *Sci Rep.* 2016;6: 33463.
- [9] Boni F, Milani M, Barbiroli A, Diomede L, Mastrangelo E, de Rosa M. Gelsolin pathogenic Gly167Arg mutation promotes domain-swap dimerization of the protein. *Hum Mol Genet.* 2018;27: 53–65.
- [10] Giorgino T, Mattioni D, Hassan A, Milani M, Mastrangelo E, Barbiroli A, et al. Nanobody interaction unveils structure, dynamics and proteotoxicity of the Finnish-type amyloidogenic gelsolin variant. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865: 648–660.

Amiloidosi da Gelsolina

Coordinator: Matteo de Rosa  
Duration (N. Years): 1 (exploratory project)  
Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

GEP15070

**Disease Name:**

Agel Amyloidosis

**Keywords:**

amyloidosis, protein, drug discovery

## Poster P.24.150

### THE ROLE OF TELOMERIC DILNCRNAS AND DDRNAS IN THE HUTCHINSON–GILFORD PROGERIA SYNDROME

**Rossiello F.\*<sup>[1]</sup>**, Aguado J.<sup>[1]</sup>, Pessina F.<sup>[1]</sup>, Eriksson M.<sup>[2]</sup>, Tripodo C.<sup>[3]</sup>, Dreesen O.<sup>[4]</sup>, D'Adda Di Fagagna F.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>I<sup>FOM</sup> Foundation—FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Department of Biosciences and Nutrition, Center for Innovative Medicine, Karolinska Institutet ~ Huddinge ~ Sweden, <sup>[3]</sup>Tumor Immunology Unit, Department of Health Sciences, University of Palermo ~ Palermo ~ Italy, <sup>[4]</sup>Cell Ageing, Skin Research Institute Singapore ~ Singapore ~ Singapore

So far DNA damage response (DDR) pathways have been studied as a proteins-only network. Recently, the role of RNA has emerged as a novel key regulator of DDR pathways. We have shown that damage-induced long non-coding RNAs (dilncRNAs) are generated at sites of DNA double-strand breaks (DSBs) and are processed into shorter DNA damage response RNAs (DDRNAS) (Francia et al., Nature, 2012; Michelini et al., Nature Cell Biology, 2017). These RNAs, by interacting and retaining DDR protein factors at the lesion, are key to mount a full DDR and their inhibition by sequence-specific antisense oligonucleotides (ASOs) allows site-specific DDR inhibition.

Dysfunctional telomeres resemble DSBs and telomere deprotection upon TRF2 knockout or inhibition leads to telomeric dilncRNAs and DDRNAS transcription. Inhibition of such telomeric transcripts by telomeric ASOs (tASOs) prevents DDR activation at dysfunctional telomeres in cultured cells and in vivo in mice (Rossiello et al., Nature Communications, 2017).

Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome (HGPS) is a rare genetic disease, characterized by premature aging features. It is caused by the expression of a mutant form of lamin A, called progerin, which leads to telomere dysfunction, DDR activation, and premature entry into cellular senescence.

Here we show that progerin-induced telomere dysfunction induces the transcription of telomeric dilncRNAs and DDRNAS. Their functional inhibition by tASOs prevents full DDR activation and premature cellular senescence in various HGPS cell systems, including HGPS patient fibroblasts, and in vivo tASOs treatment significantly enhances skin homeostasis and lifespan in a transgenic HGPS mouse model. In summary, our results demonstrate an important role for telomeric DDR activation in HGPS progeroid detrimental phenotypes in vitro and in vivo (Aguado et al., Nature Communications, in principle accepted).

The ability to specifically inhibit DDR activation at telomeres allows for the first time to determine the contribution of telomeric DDR in other physiological and pathological contexts, including accelerated ageing conditions. Finally, we have validated tASOs as a potent therapeutic agent for HGPS and potentially for any other disease caused by telomeric dysfunction.

Il ruolo dei dilncRNA e DDRNA telomerici nella sindrome di Hutchinson–Gilford

Sebbene la risposta al danno al DNA o DNA damage response (DDR) sia stata studiata finora solo nelle sue componenti proteiche, recentemente anche alcuni RNA non codificanti sono stati identificati come regolatori del DDR.

In particolare abbiamo identificato i long non-coding RNA (dilncRNA), che vengono trascritti al sito di danno al DNA e che vengono processati per generare degli RNA piu' corti, i DNA damage response RNA (DDRNA) (Francia et al., Nature, 2012; Michelini et al., Nature Cell Biology, 2017).

Questi RNA sono fondamentali per attivare il DDR completo e la loro inibizione da parte di

oligonucleotidi antisenso (ASO) con una specifica sequenza consente l'inibizione del DDR al sito genomico con quella sequenza.

La disfunzione telomerica causata per esempio da deprotezione induce la trascrizione dei diIncRNA e DDRNA telomerici. L'inibizione di questa trascrizione mediante ASO telomerici (tASO) impedisce l'attivazione del DDR ai telomeri disfunzionali nelle cellule in coltura e in vivo nei topi (Rossiello et al., Nature Communications, 2017).

La sindrome di Hutchinson-Gilford o Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome (HGPS) è una malattia genetica rara, caratterizzata da invecchiamento precoce. È causata dall'espressione di una forma mutante di lamina A, chiamata progerina, che porta alla disfunzione telomerica, all'attivazione del DDR e all'attivazione prematura della senescenza cellulare.

Abbiamo dimostrato che la disfunzione telomerica indotta dalla progerina induce la trascrizione di diIncRNA e DDRNA telomerici. La loro inibizione funzionale da parte dei tASO impedisce l'attivazione completa del DDR e la senescenza cellulare prematura in vari sistemi cellulari HGPS, inclusi fibroblasti da pazienti, e il trattamento con tASO in vivo migliora significativamente l'omeostasi cutanea e la durata della vita in un modello transgenico di topo HGPS. In sintesi, i nostri risultati dimostrano un ruolo importante dell'attivazione del DDR telomerico nei fenotipi progeroidi caratteristici della HGPS in vitro e in vivo (Aguado et al., Nature Communications, accettato).

La capacità di inibire specificamente l'attivazione del DDR ai telomeri consente per la prima volta di determinare il contributo del DDR telomerico in altri contesti fisiologici e patologici, comprese le condizioni di invecchiamento accelerato. Infine, abbiamo convalidato i tASO come un potente agente terapeutico per l'HGPS e potenzialmente per qualsiasi altra malattia causata da disfunzione telomerica.

Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, Mione M, Carninci P, d'Adda di Fagagna F. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. Nature, 2012

Michelini F, Pitchiaya S, Vitelli V, Sharma S, Gioia U, Pessina F, Cabrini M, Wang Y, Capozzo I, Iannelli F, Matti V, Francia S, Shivashankar GV, Walter NG, d'Adda di Fagagna F. Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. Nature Cell Biology, 2017

Rossiello F, Aguado J, Sepe S, Iannelli F, Nguyen Q, Pitchiaya S, Carninci P, d'Adda di Fagagna F. DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs. Nature Communications, 2017

Sindrome di Hutchinson–Gilford

Coordinator: Fabrizio d'Adda di Fagagna

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GGP17111

**Disease Name:**

Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome

**Keywords:**

Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome, Telomeres, Antisense oligonucleotides

## Poster P.24.151

### IDENTIFICATION OF CORRECTORS OF LOWE SYNDROME

Staiano L.<sup>[1]</sup>, Morra V.<sup>[1]</sup>, Vicinanza M.<sup>[1]</sup>, Medina Sanabria D.L.<sup>[1]</sup>, Santoro M.<sup>[1]</sup>, Di Tullio G.<sup>[1]</sup>, Nusco E.<sup>[1]</sup>, Nussbaum R.<sup>[2]</sup>, Devuyst O.<sup>[3]</sup>, De Matteis M.A.\*<sup>[4]</sup>

<sup>[1]</sup>TIGEM ~ POZZUOLI (NA) ~ Italy, <sup>[2]</sup>INVITAE ~ SAN FRANCISCO, CA ~ United States of America, <sup>[3]</sup>UNIVERSITY OF ZURICH ~ ZURICH ~ Switzerland, <sup>[4]</sup>~ NAPOLI ~ Italy

Lowe Syndrome is a rare X-linked genetic disease (1:500,000 newborn males) caused by mutations in OCRL1, the gene encoding a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase. Lowe Syndrome patients present congenital cataracts, central hypotonia, intellectual disabilities and renal Fanconi syndrome (loss of salts and low molecular weight proteins with the urine). OCRL associates with early endocytic and endolysosomal compartments and with the Golgi complex. By regulating the local levels of PI(4,5)P2 OCRL controls endocytic trafficking of different receptors (M6PR, TfR and LRP2), early phagocytic steps, cytokinesis, primary cilium formation, and autophagy.

Among the endocytic trafficking defects arising from the lack of OCRL we exploited the trafficking jam at the level of early endosomes that de-localizes MPR from the Golgi complex to the peripheral early endosomes and impairs the internalization of megalin/LRP2 ligands.

We set up a high content screening (HCS), using the Library of Pharmacologically Active Compounds, which includes many FDA approved drugs, looking for correctors of phenotypes induced by OCRL depletion.

59 out of the initial 1280 compounds rescued the phenotypes and were further validated in cells isolated from Lowe syndrome patients. The best 6 compounds are currently under further evaluation in a mouse model of Lowe Syndrome.

### IDENTIFICAZIONE DI CORRETTORI DELLA SINDROME DI LOWE

La sindrome di Lowe è una rara malattia genetica legata all'X (1: 500.000 neonati maschi) causata da mutazioni nell'OCRL1, il gene che codifica per la fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato 5-fosfatasi. I pazienti con sindrome di Lowe presentano cataratta congenita, ipotonia centrale, disabilità intellettive e sindrome renale di Fanconi (perdita di sali e proteine a basso peso molecolare con l'urina). OCRL si associa ai primi compartimenti endocitici ed endolisosomiali e al complesso del Golgi. Regolando i livelli locali di PI (4,5) P2 OCRL controlla il traffico endocitico di diversi recettori (M6PR, TfR e LRP2), fasi fagocitiche precoci, citochinesi, formazione del ciglio primario e autofagia.

Tra i difetti del traffico endocitico derivanti dalla mancanza di OCRL abbiamo evidenziato ingorghi di traffico a livello degli endosomi precoci che delocalizzano MPR dal complesso Golgi ai primi endosomi periferici e compromettono l'internalizzazione dei ligandi megalin / LRP2.

Abbiamo effettuato saggi di high content screening (HCS), utilizzando una library di composti



farmacologicamente attivi, che include molti farmaci approvati dalla FDA, alla ricerca di correttori dei fenotipi indotti dalla deplezione di OCRL.

59 dei 1280 composti iniziali hanno dimostrato di avere un effetto sul fenotipo e sono stati ulteriormente validati in cellule isolate da pazienti con sindrome di Lowe. I migliori 6 composti sono attualmente sotto ulteriore valutazione in un modello murino di Sindrome di Lowe.

OCRL deficiency impairs endolysosomal function in a humanized mouse model for Lowe syndrome and Dent disease.

Festa BP, Berquez M, Gassama A, Amrein I, Ismail HM, Samardzija M, Staiano L, Luciani A, Grimm C, Nussbaum RL, De Matteis MA, Dorchies OM, Scapozza L, Wolfer DP, Devuyst O.

Hum Mol Genet. 2019 Jun 15;28(12):1931-1946. doi: 10.1093/hmg/ddy449.

PMID: 30590522 Free PMC Article

Sindrome di Lowe

Coordinator: Maria Antonietta De Matteis

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TIGEM

**Disease Name:**

Lowe Syndrome

**Keywords:**

LOWE SYNDROME, OCRL1, OCRL DEPLETION

## 25\_Genetic vascular disease

## Poster P.25.152

### ENDOTHELIAL CELL CLONAL EXPANSION IN THE DEVELOPMENT OF CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATIONS

Dejana E.<sup>[1]</sup>, Malinverno M.<sup>\*[1]</sup>, Valentino M.E.<sup>[1]</sup>, Maderna C.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>I FOM, FIRC Institute of Molecular Oncology ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>~ Milano ~ Italy

Cerebral cavernous malformation (CCM) is a neurovascular familial disease characterised by capillary-venous cavernomas, and is due to loss-of-function mutations to anyone of three CCM genes (CCM1, CCM2, CCM3). Familial CCM follows a two-hit mechanism similar to that of tumour suppressor genes but only a small fraction of endothelial cells form the malformations. We report that in mouse models and in human patients, endothelial cells lining the lesions have different features from the surrounding endothelium, as they express mesenchymal/stem-cell markers (End/MT). In the present work we found that cavernomas originate from clonal expansion of few Ccm3-null endothelial cells that express End/MT and stem cell markers. These cells attract surrounding wild-type endothelial cells inducing them to express End/MT markers and to contribute to cavernoma growth. These results open novel pathways to treat CCM by pharmacological tools.

Il ruolo della espansione clonale delle cellule endoteliali nella formazione delle malformazioni vascolari cavernose

Matteo Malinverno, Claudio Maderna, Maria Elena Valentino and Elisabetta Dejana  
FIRC Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy

Le malformazioni vascolari cavernose del cervello (CCM) costituiscono una malattia neurovascolare rara di origine familiare che causa molteplici problemi neurologici agli individui affetti. La patologia è caratterizzata da mutazioni inattivanti uno dei tre geni che codificano le proteine del complesso CCM (CCM1, CCM2 or CCM3). Durante la nostra ricerca abbiamo osservato che, inattivando anche uno solo dei tre geni CCM nei topi, si riproduceva in maniera fedele la malattia. Abbiamo anche documentato che le cellule endoteliali che formano i cavernomi sono diverse dalle cellule dei vasi normali. Infatti, acquisiscono caratteristiche simili ai fibroblasti e crescono in maniera clonale incontrollata. Durante la loro proliferazione attraggono cellule endoteliali normali che proliferando contribuiscono all'evolversi della patologia. Questi risultati sperimentali aprono nuove prospettive per la cura farmacologica dei CCM.

1 Risau W. Mechanisms of angiogenesis.  
Nature 1997;386:671–674.

2 Shi Q, Rafii S, Wu MH et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood 1998;92:362–367.

3 Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997;275:964–967.

4 Stanczuk L, Martinez-Corral I, Ulvmar

MH et al. cKit lineage hemogenic endothelium-derived cells contribute to mesenteric lymphatic vessels. *Cell Rep* 2015 Mar 10. pii: S2211-1247(15)00172-2.

5 Barber CL, Iruela-Arispe ML. The everelusive endothelial progenitor cell: Identities, functions and clinical implications. *Pediatr Res* 2006;59:26R–32R.

6 Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol* 2014;229:10–16.

7 Kovacic JC, Boehm M. Resident vascular progenitor cells: An emerging role for nonterminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology. *Stem Cell Res* 2009;2:2–15.

8 Gritz E, Hirschi KK. Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2016 Apr;73(8):1547–1567.

9 Clarke RL, Yzaguirre AD, Yashiro-Ohtani Y et al. The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol* 2013;15:502–510.

10 Fang S, Wei J, Pentimikko N et al. Generation of Functional blood vessels from a single c-kit1 adult vascular endothelial stem cell. *PLoS Biol* 2012;10:e1001407.

11 Naito H, Kidoya H, Sakimoto S et al. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J* 2011;31:842–855.

12 Timmermans F, Plum J, Yoder MC et al. Endothelial progenitor cells: Identity defined? *J Cell Mol Med* 2009;13:87–102.

13 Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420–1428.

14 Medici D, Kalluri R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* 2012;22:379–384.

15 Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007;13:952–961.

16 Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R et al.

EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature* 2013;498:492–496.

17 Thiaville MM, Huang JM, Kim H et al. DNA-binding motif and target genes of the imprinted transcription factor PEG3. *Gene* 2013;512:314–320.

18 Relaix F, Weng X, Marazzi G et al. Pw1, a novel zinc finger gene implicated in the myogenic and neuronal lineages. *Dev Biol* 1996;177:383–396.

19 Relaix F, Wei XJ, Wu X et al. Peg3/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNFNFkappaB signal transduction pathway. *Nat Genet* 1998;18:287–291.

20 Relaix F, Wei X. J, Li W et al. Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2105–2110.

21 Coletti D, Yang E, Marazzi G et al. TNFalpha inhibits skeletal myogenesis through a PW1-dependent pathway by recruitment of caspase pathways. *EMBO J* 2002;21:631–642.

22 Schwarzkopf M, Coletti D, Sassoon D et al. Muscle cachexia is regulated by a p53-PW1/Peg3-dependent pathway. *Genes Dev* 2006;20:3440–3452.

23 Besson V, Smeriglio P, Wegener A et al. PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies multiple adult stem and progenitor cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:11470–11475.

24 Cooley BC, Nevado J, Mellad J et al. TGF-b signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med* 2014;6:227ra34.

25 Chen P-Y, Qin L, Baeyens N et al. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest* 2015;125:4514–4528.

26 Hellström M, Phng L-K, Hofmann JJ et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis.

Nature 2007;445:776–780.

27 Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:

28 Dierick F, Hery T, Hoareau-Coudert B et al. Resident PW11 progenitor cells participate in vascular remodeling during pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2016 Mar 4;118(5):822–33.

29 Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: Concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 2015;125:2605–2613.

30 Liakhovitskaia A, Rybtsov S, Smith T et al. Runx1 is required for progression of CD411 embryonic precursors into HSCs but not prior to this. *Development* 2014;141: 3319–3323.

31 Hirschi KK. Hemogenic endothelium during development and beyond. *Blood* 2012; 119:4823–4827.

32 Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;3:625–636.

33 Bonfanti C, Rossi G, Tedesco FS et al. PW1/Peg3 expression regulates key properties that determine mesoangioblast stem cell competence. *Nat Commun* 2015;6: 6364.

## Malformazioni Cavernose Cerebrali

Coordinator: Elisabetta Dejana

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

### **Telethon Project (nr):**

GGP19202

### **Disease Name:**

Cerebral Cavernous Malformations

### **Keywords:**

endothelial cells, Blood Brain Barrier, clonal expansion

## Poster P.25.153

### **CROSSTALK BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN THE PATHOGENESIS OF CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION (CCM) DISEASE: FROM THE IDENTIFICATION OF BASIC MECHANISMS TO THE DEVELOPMENT OF THERAPEUTIC STRATEGIES**

Perrelli A.<sup>[1]</sup>, Fornelli C.<sup>[1]</sup>, Goitre L.<sup>[1]</sup>, Antognelli C.<sup>[4]</sup>, Marchi S.<sup>[2]</sup>, Finetti F.<sup>[3]</sup>, Pinton P.<sup>[2]</sup>, Trabalzini L.<sup>[3]</sup>, Saverio Francesco R.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Torino ~ Torino ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Ferrara ~ Ferrara ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Siena ~ Siena ~ Italy, <sup>[4]</sup>University of Perugia ~ Perugia ~ Italy

Cerebral Cavernous Malformation (CCM) is a major cerebrovascular disease affecting 0.3-0.5% of the human population. It is characterized by the formation of single or multiple (up to hundreds) clusters of abnormally dilated and leaky capillaries, which occur mainly in the central nervous system and may result in severe clinical symptoms at any age, including recurrent headaches, focal neurological deficits, seizures and intracerebral hemorrhage (ICH). It is a disease of proven genetic origin, which may arise sporadically or as autosomal dominant inherited condition with incomplete penetrance and highly variable expressivity. Three disease genes, namely CCM1/KRIT1, CCM2 and CCM3, have been identified and proven to be implicated in the regulation of major cellular structures and mechanisms, including cell-cell and cell-matrix adhesion and actin cytoskeleton dynamics, suggesting that they may act as pleiotropic regulators of cellular homeostasis. Indeed, our original discoveries in cellular and animal models have demonstrated that the emerging pleiotropic functions of CCM proteins are mainly due to their ability to modulate redox-sensitive pathways and mechanisms involved in adaptive responses to oxidative stress and inflammation, thus contributing to the preservation of cellular homeostasis and stress defenses. In particular, whereas there is now clear evidence that mutations of CCM genes are not sufficient to cause CCM disease, we have originally demonstrated that they affect major molecular mechanisms involved in cellular redox homeostasis and defense against oxidative stress and inflammation, including redox signaling, autophagy and antioxidant defenses. Consistently, our genetic studies in large CCM patient cohorts have suggested that interindividual differences in CCM disease severity can be attributable to genetic susceptibility factors related to differences in sensitivity to oxidative stress and inflammation. Overall, our findings point to a novel pathogenic mechanism whereby CCM lesions may result from an impaired endothelial cell defense against local oxidative stress and inflammatory events, thus opening novel preventive and therapeutic perspectives.

**IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO CRUCIALE DELLO STRESS OSSIDATIVO E DELL'INFIAMMAZIONE NELLA PATOGENESI DELLE MALFORMAZIONI CAVERNOSE CEREBRALI: DALLA SCOPERTA DEI MECCANISMI MOLECOLARI ALLO SVILUPPO DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE**

La Malformazione Cavernosa Cerebrale (CCM) è una grave malattia cerebrovascolare che colpisce lo 0,3-0,5% della popolazione umana. È caratterizzata dalla formazione di capillari sanguigni anormalmente dilatati e fragili, che si riscontrano principalmente nel sistema nervoso centrale attraverso analisi di risonanza magnetica e possono provocare gravi sintomi clinici a qualsiasi età, tra cui mal di testa ricorrenti, deficit neurologici focali, attacchi epilettici ed emorragia intracerebrale. È una malattia di provata origine genetica, che può insorgere sporadicamente o come condizione

ereditaria autosomica dominante con penetranza incompleta ed espressività altamente variabile. Sono stati identificati tre geni-malattia, CCM1/KRIT1, CCM2 e CCM3, che sono stati dimostrati essere implicati nella regolazione di importanti strutture e meccanismi cellulari, tra cui l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice e l'organizzazione del citoscheletro di actina, suggerendo un potenziale coinvolgimento nella regolazione dell'omeostasi cellulare. In effetti, le nostre scoperte originali in modelli cellulari e animali hanno dimostrato che le emergenti molteplici funzioni dei geni CCM sono principalmente dovute alla loro capacità di modulare importanti meccanismi molecolari implicati nel mantenimento dell'omeostasi ossidoriduttiva (redox) cellulare e nelle risposte cellulari allo stress ossidativo e all'infiammazione. In particolare, mentre da una parte è ormai emerso chiaramente che le mutazioni dei geni CCM non sono sufficienti a causare la malattia, i risultati sperimentali da noi ottenuti nell'ambito del nostro progetto Telethon hanno dimostrato che le proteine codificate da questi geni sono coinvolte nella regolazione di importanti meccanismi molecolari deputati alle difese cellulari contro lo stress ossidativo e l'infiammazione, tra cui l'autofagia e i meccanismi di difesa antiossidante e anti-infiammatoria delle cellule. Coerentemente, i nostri studi genetici in grandi coorti di pazienti affetti dalla forma familiare della malattia CCM hanno suggerito che le differenze interindividuali nella gravità di questa malattia possono essere attribuibili a fattori di suscettibilità genetica correlati a differenze interindividuali di sensibilità allo stress ossidativo e all'infiammazione. Nel complesso, i risultati da noi ottenuti hanno evidenziato nuovi meccanismi patogenetici in base ai quali lo sviluppo di lesioni CCM e le loro manifestazioni sintomatiche possono derivare da una compromissione più o meno accentuata delle difese delle cellule endoteliali contro eventi di stress ossidativo e infiammatori causata da mutazioni dei geni CCM, schiudendo così nuove prospettive per la prevenzione e il trattamento di questa malattia genetica.

1. Cianfruglia L, Perrelli A, Fornelli C, Magini A, Gorbi S, Salzano AM, Antognelli C, Retta F, Benedetti V, Cassoni P, Emiliani C, Principato G, Scaloni A, Armeni T, Retta SF\*. (2019). KRIT1 Loss-Of-Function Associated with Cerebral Cavernous Malformation Disease Leads to Enhanced S-Glutathionylation of Distinct Structural and Regulatory Proteins. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Jan 17;8(1). pii: E27.
2. De Luca E, Pedone D, Moglianetti M, Pulcini D, Perrelli A, Retta SF\* & Pompa PP\* (2018). Multifunctional Platinum@BSA-Rapamycin Nanocarriers for the Combinatorial Therapy of Cerebral Cavernous Malformation. *ACS Omega*, 2018 Nov 30;3(11):15389-15398.
3. Perrelli A, Goitre L, Salzano AM, Moglia A, Scaloni A, and Retta SF\*. (2018). Biological Activities, Health Benefits, and Therapeutic Properties of Avenanthramides: From Skin Protection to Prevention and Treatment of Cerebrovascular Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 6015351.
4. Antognelli C, Trapani E, Delle Monache S, Perrelli A, Daga M, Pizzimenti S, Barrera G, Cassoni P, Angelucci A, Trabalzini L, Talesa VN, Goitre L, Retta SF\*. (2018). KRIT1 loss-of-function induces a chronic Nrf2-mediated adaptive homeostasis that sensitizes cells to oxidative stress: Implication for Cerebral Cavernous Malformation disease. *Free Radic Biol Med*. 2018 Feb 1; 115:202-218. Epub 2017 Nov 21.
5. Antognelli C, Trapani E, Delle Monache S, Perrelli A, Fornelli C, Retta F, Cassoni P, Talesa VN, Retta SF\*. (2017). Data in support of sustained upregulation of adaptive redox homeostasis mechanisms caused by KRIT1 loss-of-function. *Data Brief*. 2017 Dec 13; 16:929-938.



6. Goitre L, DiStefano PV, Moglia A, Nobiletti N, Baldini E, Trabalzini L, Keubel J, Trapani E, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Sarelius IH, Retta SF\* & Glading AJ\*. (2017). Up-regulation of NADPH oxidase-mediated redox signaling contributes to the loss of barrier function in KRIT1 deficient endothelium. *Scientific Reports*, 2017 Aug 15; 7(1):8296.
7. Retta SF\* and Glading AJ. (2016). Oxidative stress and inflammation in cerebral cavernous malformation disease pathogenesis: Two sides of the same coin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016 Dec; 81(Pt B):254-270.
8. Marchi S, Trapani E, Corricelli M, Goitre L, Pinton P, Retta SF\*. (2016). Beyond Multiple Mechanisms and a Unique Drug: Defective Autophagy as Pivotal Player in Cerebral Cavernous Malformation Pathogenesis and Implications for Targeted Therapies. *Rare Diseases*, 2016 Jan 25; 4:1, e1142640.
9. Marchi S, Retta SF\*, Pinton P\*. (2016). Cellular processes underlying cerebral cavernous malformations: Autophagy as another point of view. *Autophagy*, 2016 Feb; 12(2):424-5.
10. Moglianetti M, De Luca E, Pedone D, Marotta R, Catelani T, Sartori B, Amenitsch H, Retta SF, Pompa PP. (2016). Platinum nanozymes recover cellular ROS homeostasis in oxidative stress-mediated disease model. *Nanoscale*, 2016 Feb 14; 8(6):3739-52.
11. Choquet H, Trapani E, Goitre L, Trabalzini L, Akers A., Fontanella M, Hart BL, Morrison LA, Pawlikowska L, Kim H, Retta SF\*. (2016). Cytochrome P450 and matrix metalloproteinase genetic modifiers of disease severity in Cerebral Cavernous Malformation type 1. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016 Jan 19; 92:100-109.
12. Marchi S, Corricelli M, Trapani E, Bravi L, Pittaro A, Delle Monache S, Ferroni L, Patergnani S, Missiroli S, Goitre L, Trabalzini L, Rimessi A, Giorgi C, Zavan B, Cassoni P, Dejana E, Retta SF\*, Pinton P\*. (2015). Defective autophagy is a key feature of cerebral cavernous malformations. *EMBO Molecular Medicine*, 2015. 7(11):1403-1417.
13. Trapani E, Retta SF\*. (2015). Cerebral cavernous malformation (CCM) disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Journal of Neurosurgical Sciences*, 2015 Sep; 59(3):201-9.
14. Moglia A., Goitre L., Gianoglio S., Baldini E., Trapani E., Genre A., Scattina A., Dondo G., Trabalzini L., Beekwilder J., Retta S.F.\* (2015) Evaluation of the bioactive properties of avenanthramide analogues produced in recombinant yeast. *BioFactors*, 2015, 41(1):15-27.
15. Gibson C., Zhu W., Davis C.T., Bowman-Kirigin J.A., Chan A.C., Ling J., Walker A.E., Goitre L., Delle Monache S., Retta S.F., Shiu Y-T E., Grossmann A.H., Thomas K.R., Donato A.J., Lesniewski L.A., Whitehead K.J., Li D.J. (2015) Strategy for Identifying Repurposed Drugs for the Treatment of Cerebral Cavernous Malformation. *Circulation*, 2015; 131(3):289-99.
16. Fontanella MM, Panciani PP, Spina G, Roca E, Migliorati K, Ambrosi C, Sturiale CL, Retta SF (2015) Professional athletes and cerebral cavernomas: an obstacle to overcome. *Journal of Sports*

Medicine and Physical Fitness, 2015 Sep; 55(9):1046-7.

\* Corresponding author

Malformazioni Cavernose Cerebrali

Coordinator: Saverio Francesco Retta

Partners: Paolo Pinton, Lorenza Trabalzini

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15219

**Disease Name:**

Cerebral Cavernous Malformations

**Keywords:**

Genetic cerebrovascular disease, Cerebral Cavernous Malformation (CCM), Redox signaling and oxidative stress and inflammatory responses

## 26\_ Undiagnosed diseases with proven genetic origin

## Poster P.26.154

### THREE YEARS OF THE TELETHON UNDIAGNOSED DISEASES PROGRAM: DATA AND FINDINGS

Casari G.<sup>[1]</sup>, Selicorni A.<sup>[2]</sup>, Brunetti--Pierri N.<sup>[3]</sup>, Pinelli M.\*<sup>[1]</sup>, Torella A.L.<sup>[1]</sup>, Castello R.<sup>[1]</sup>, Cappuccio G.<sup>[1]</sup>, Musacchia F.<sup>[1]</sup>, Mutarelli M.<sup>[1]</sup>, Carrella D.<sup>[1]</sup>, Maitz S.<sup>[2]</sup>, Vitiello G.<sup>[1]</sup>, Fecarotta S.<sup>[4]</sup>, Leuzzi V.<sup>[5]</sup>, Scala M.<sup>[6]</sup>, Capra V.<sup>[6]</sup>, Nigro V.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), <sup>[2]</sup>ASST Lariana, Sant'Anna General Hospital, Pediatric Department, Como, <sup>[3]</sup>TIGEM and Università di Napoli Federico II Napoli, <sup>[4]</sup>Department of Translational Medicine, Section of Pediatrics, Federico II University, Naples, Italy, <sup>[5]</sup>Department of Human Neuroscience, Sapienza University of Rome, Rome, Italy, <sup>[6]</sup>Neurosurgery service, Giannina Gaslini Institute, Genoa, Italy

#### Three years of the Telethon Undiagnosed Diseases Program: data and findings

We present the experience of the first three years of the Telethon Undiagnosed Diseases Program (TUDP), a pilot program devoted to unsolvable pediatric patients with complex syndromes. All children with complex disorders of suspected genetic cause that have been investigated by arrayCGH and other genetic and biochemical tests with negative results, are discussed and prioritized in monthly clinical meetings. Priority has been given to most severe conditions and a long sequel of negative tests. HPO at Phenome Central is used for phenotyping. Patients may be recruited using a web form at [www.telethon.it](http://www.telethon.it) or presented by the fifteen affiliated Italian pediatric centers. From February 2016 to April 2019, 634 undiagnosed families were proposed.

One-hundred-forty-five were considered as low-priority either because a diagnosis could be possible with patient-data evaluation or the clinical manifestations were outside inclusion criteria. The selected patients were studied with trio/quartet Whole Exome Sequencing (WES) based on Agilent SureSelect and Illumina technologies. Average sequence coverage ranged between 120 and 150x with 150 x 2 read length.

Of the 489 enrolled families, 216 completed the entire diagnostic NGS workflow and final results has been provided. In 95 families (44%) the causative variants were detected and in further 32 (15%) candidate genes were identified. Among the conclusive cases, 64 resulted to be caused by de novo mutations, 20 by autosomal recessive, 10 by X-linked and one by autosomal dominant with variable expression. In 86 trios (40%) no putative causative variant was identified.

Single gene affected multiple families: DDXD3 and ASXL3 were mutated in three and AHDC, ARID1B, ASXL1, EBF3, EEF1A2, GRIN1, IRF2BPL, RARS2, and SMAD4 were mutated in two families. Only the two patients affected by SMAD4 carried the same recurring I500V variant.

Thanks to the enrolment strategy, TUDP allowed a general expansion of the gene-phenotype knowledge. Twenty-two patients showed an extended or more severe phenotype than that already described for the mutated genes and for two (CREEBP and ATP6V1B2) the phenotypes were so different that may be suspected allelic disorders. Furthermore, TUDP participated to the discovery of two new disease genes: POLR2A and DHX37. Unsolved cases are being studied by WGS or by linked read WES using 10x technology.

Tre anni di Telethon Undiagnosed Diseases Program: dati e risultati

Presentiamo l'esperienza dei primi tre anni del Telethon Undiagnosed Diseases Program (TUDP), un

programma pilota dedicato a pazienti pediatriche senza diagnosi affetto da sindromi complesse. I pazienti con disturbi complessi di sospetta causa genetica che sono stati studiati tramite arrayCGH e altri test genetici e biochimici con risultati negativi, sono discussi e prioritizzati in riunioni cliniche che vengono tenute su base mensile. I criteri di prioritizzazione si basano sulla gravità del fenotipo e la quantità di test diagnostici con esito negativo. Human Phenotype Ontology è lo strumento che viene utilizzato per la classificazione fenotipica. I pazienti possono essere reclutati utilizzando un modulo web su [www.telethon.it](http://www.telethon.it) o presentato da uno dei quindici centri pediatrici italiani affiliati. Da febbraio 2016 ad aprile 2019, sono stati discussi 634 casi con almeno un figlio affetto da una malattia di probabile origine genetica non diagnosticata.

Centoquarantacinque sono stati considerati a bassa priorità, o perché una diagnosi poteva essere possibile con la valutazione dei dati dei pazienti o le manifestazioni cliniche erano al di fuori dei criteri di inclusione. I pazienti selezionati sono stati studiati eseguendo analisi di Whole Exome Sequencing (WES) basate sulle tecnologie Agilent SureSelect e Illumina utilizzando sempre le sequenze dei genitori come confronto.

La copertura della sequenza media varia tra 120 e 150x con una lunghezza di lettura di 150 x 2.

Delle 489 famiglie arruolate, 216 hanno completato l'intero flusso di lavoro diagnostico NGS e sono stati forniti loro dei referti. In 95 famiglie (44%) sono state rilevate le varianti genetiche causative e in altri 32 (15%) sono stati identificati dei geni candidati.

Tra le diagnosi effettuate, abbiamo riscontrato 64 sindromi causate da mutazioni insorte de novo, 20 da autosomiche recessive, 10 causate da mutazioni legate all' X e una autosomica dominante ad espressione variabile.

In 86 trios (40%) non è stata identificata nessuna variante causativa putativa.

Alcuni geni sono stati trovati mutati in più di una delle famiglie analizzate: i geni DDXD3 e ASXL3 sono stati ritrovati mutati in tre famiglie mentre AHDC, ARID1B, ASXL1, EBF3, EEF1A2, GRIN1, IRF2BPL, RARS2 e SMAD4 sono stati riscontrati in due famiglie. Solo i due pazienti affetti da SMAD4 presentavano la stessa variante I500V.

Grazie alla strategia di arruolamento, TUDP ha consentito un'espansione generale delle conoscenze sulla correlazione genotipo-fenotipo. Ventidue pazienti hanno mostrato un fenotipo esteso o più grave di quello già descritto per i geni mutati e per due (CREEBP e ATP6V1B2) i fenotipi erano così diversi che potrebbero essere sospettati disturbi allelici. Inoltre, TUDP ha partecipato alla scoperta di due nuovi geni-malattia: POLR2A e DHX37. I casi irrisolti sono in fase di studio mediante WGS o mediante lettura collegata WES utilizzando la tecnologia 10x.

Malattie non diagnosticate

Malattie non diagnosticate

Coordinator: Giorgio Casari

Partners: Angelo Selicorni, Nicola Brunetti-Pierri

Duration (N. Years): 4

Starting year: 2016

### **Telethon Project (nr):**

GSP15001

### **Disease Name:**

Undiagnosed Diseases

**Keywords:**

## 27\_Genetic Biobanks

## Poster P.27.155

### TELETHON NETWORK OF GENETIC BIOBANKS

Casareto L.<sup>[9]</sup>, Stroppiano M.<sup>[1]</sup>, Coviello D.<sup>[1]</sup>, Cilia R.<sup>[2]</sup>, Renieri A.<sup>[3]</sup>, Pegoraro E.<sup>[4]</sup>, Sciacco M.<sup>[5]</sup>, Mora M.<sup>[6]</sup>, Merla G.<sup>[7]</sup>, Politano L.<sup>[8]</sup>, Garavaglia B.<sup>[6]</sup>, Sangiorgi L.\*<sup>[9]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Centro Parkinson, ASST Gaetano Pini-CTO ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Siena and Azienda Ospedaliera Universitaria Senese ~ Siena ~ Italy, <sup>[4]</sup>Università di Padova, Azienda Ospedaliera Universitaria ~ Padova ~ Italy, <sup>[5]</sup>Dino Ferrari Centre, IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan ~ Milano ~ Italy, <sup>[6]</sup>Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta ~ Milano ~ Italy, <sup>[7]</sup>IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza ~ San Giovanni Rotondo ~ Italy, <sup>[8]</sup>Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Azienda Ospedaliera Universitaria "Luigi Vanvitelli" ~ Napoli ~ Italy, <sup>[9]</sup>Istituto Ortopedico Rizzoli ~ Bologna ~ Italy

The Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB) is a non-profit organisation of 11 Italian biorepositories created in 2007 to form a virtually unique catalogue of biospecimens and associated data (Filocamo et al., 2013).

In more than ten years of activity, several improvements have been achieved thanks to the development of the centrally coordinated IT platform which has enabled (i) standardisation and harmonisation of procedures; (ii) creation of an updated TNGB online catalogue (<http://biobanknetwork.telethon.it/>) listing over 1,000 pathologies; and (iii) development of a common sample access policy, based on predefined criteria and managed via a shared request control panel assuring transparency and impartiality. Additionally, effective actions for the patient engagement have been constantly pursued (i.e., their inclusion in the TNGB Advisory Board and involvement in drafting biobank policies and procedures) (Baldo et al., 2016).

2018 was the year of turning point in TNGB existence: new scientific coordinator, new governance bodies members, new funding method and consequent new strategic and operational activities.

In particular, thematic working groups have been included in the governance in order to facilitate the active involvement of biobanks. They are composed of the biobank directors/staff and focus on (i) the form/document update and procedure/policy revision, including the TNGB Charter, taking into account the GDPR coming into force; (ii) the finalisation of the Patient Organisation agreement; and more importantly (iii) the TNGB long-term sustainability.

This latter comprises the update of the cost-recovery list, creation of other funding opportunities, including industry collaborations.

TNGB Advisory Board composition strengthened in term of members: the consultative body has been indeed enriched of two international experts contributing to give to TNGB worldwide visibility, a turnover of other members has been introduced. A position for a representative of the patient organisations has been kept.

Along with the thematic carried on by the working groups, the development of a more effective communication strategy has been recognised as crucial for TNGB visibility: indeed, TNGB social media profile have been recently activated.

Concerning the ELSI field, TNGB has been continuing its extensive work involving lay members of Patient Organisations and experts in the field which led to a very comprehensive informed consent model adopted by all the biobanks balancing, as much as possible, the constitutional interest of the freedom of scientific research and the protection of self-determination of people taking part in it.



TNGB continued also its interaction with other European biobanking realities, such as BBMRI, EuroBioBank network and RD-Connect platform, of which is an active member.

Le Biobanche di Malattie Rare sono unità di servizio non-profit, finalizzate alla raccolta, conservazione e distribuzione di campioni biologici con l'obiettivo di fornire servizi alle persone affette da malattie genetiche, alle Associazioni di Pazienti e alla comunità scientifica attraverso la conservazione, nel tempo, di campioni biologici secondo elevati standard di qualità e renderli disponibili successivamente per diagnosi e ricerca. Diversi esempi dimostrano come l'accesso a un elevato numero di campioni faciliti l'individuazione di nuovi geni malattia e lo sviluppo di terapie. La Rete Telethon di Biobanche Genetiche (TNGB) è un'organizzazione senza scopo di lucro di 11 biobanche distribuite su tutto il territorio italiano costituita nel 2007 per coordinare, a livello informatico, biobanche qualificate in modo da centralizzare campioni in un unico catalogo (<http://biobanknetwork.telethon.it/>) e migliorare l'accesso ai servizi, assicurando la qualità dei campioni per i ricercatori e la tutela della privacy per i partecipanti durante l'intero percorso, dalla raccolta e conservazione all'uso di campioni e dati. La Rete, attraverso le Biobanche affiliate, raccoglie linee cellulari, DNA e tessuti; ad oggi, sono conservati complessivamente oltre 120.000 campioni per circa 1.000 differenti difetti genetici.

L'adozione di una piattaforma informatica centralizzata, oltre alla standardizzazione e all'armonizzazione delle procedure, ha consentito lo sviluppo di una politica comune di accesso, basata su criteri predefiniti che assicura trasparenza e imparzialità. Inoltre, negli anni sono state costantemente perseguite azioni per il coinvolgimento dei pazienti.

Il 2018 per il TNGB è stato un anno di svolta: nuovo coordinatore scientifico, nuovi componenti degli organi costitutivi, nuovi metodi di finanziamento e nuove strategie.

In particolare, sono stati attivati gruppi di lavoro tematici che si sono occupati di i) mantenere aggiornati documenti e procedure tenendo in considerazione l'entrata in vigore del regolamento europeo generale sulla protezione dei dati (GDPR); (ii) finalizzare il modello di accordo tra biobanca e associazione di pazienti; e, soprattutto, (iii) pianificare azioni per la sostenibilità a lungo termine di TNGB.

Lo sviluppo di una strategia di comunicazione più efficace è stato inoltre riconosciuto fondamentale per la visibilità di TNGB: infatti, profili social media di TNGB sono stati recentemente attivati.

Per quanto concerne le tematiche etiche, sociali e legali (ELSI), TNGB prosegue le attività partecipative con le Associazioni di Pazienti ed esperti del settore per la stesura di un modello di consenso informato, completo, che mira il più possibile, a bilanciare l'interesse costituzionale alla libertà della ricerca scientifica e la tutela dell'autodeterminazione delle persone che vi partecipano.

La TNGB continua infine ad interagire attivamente con altre realtà europee, come BBMRI, EuroBioBank e RD-Connect.

Filocamo M, Baldo C, Goldwurm S, Renieri A, Angelini C, Moggio M, Mora M, Merla G, Politano L, Garavaglia B, Casareto L, Bricarelli FD; Telethon Network of Genetic Biobanks Staff. Telethon Network of Genetic Biobanks: a key service for diagnosis and research on rare diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Aug 30;8:129.

doi: 10.1186/1750-1172-8-129.

Baldo C, Casareto L, Renieri A, Merla G, Garavaglia B, Goldwurm S, Pegoraro E, Moggio M, Mora M, Politano L, Sangiorgi L, Mazzotti R, Viotti V, Meloni I, Pellico MT, Barzaghi C, Wang CM, Monaco L, Filocamo M. The alliance between genetic biobanks and patient organisations: the experience of the Telethon Network of Genetic Biobanks. *Orphanet J Rare Dis.* 2016 Oct 24;11(1):142.

Malattie Genetiche in generale

Coordinator: Luca Sangiorgi

Partners: Marina Stroppiano, Domenico Coviello, Roberto Cilia, Alessandra Renieri, Elena Pegoraro, Monica Sciacco, Marina Mora, Giuseppe Merla, Luisa Politano, Barbara Garavaglia

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2018

**Telethon Project (nr):**

GTB18001

**Disease Name:**

Genetic Diseases in general

**Keywords:**

biobanking, networking, rare genetic diseases

## 28\_Institutional posters

## Poster P.28.156

### TIGEM INSTITUTE OVERVIEW

#### Tigem S.\*

*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli ~ Italy*

Istituto Telethon di Genetica e Medicina

Malattie Genetiche

#### **Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

#### **Disease Name:**

Genetic Diseases

#### **Keywords:**

## Poster P.28.157

### SR-TIGET INSTITUTE OVERVIEW

Paniccia A.\*<sup>[1]</sup>, Naldini L.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute; Fondazione Telethon ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan; Vita-Salute San Raffaele University, Milan ~ Milan ~ Italy

The San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) was created in 1995 as a joint-venture between the Telethon Foundation and the San Raffaele Scientific Institute in Milan, with the mission to perform cutting edge research on gene and cell therapy and to translate its results into therapeutic advances for genetic diseases. The Institute comprises 13 Experimental Research Units and 2 Clinical Research Units with specific expertise for conducting clinical trials of Advanced Therapy Medicinal Products, with a staff of about 220 people coming from more than 10 different countries.

Research at SR-Tiget spans from basic to pre-clinical and early phase clinical studies and the Institute's portfolio of gene and cell therapies now embraces the full spectrum of drug development up to the market. The integration of basic and clinical research is probably the most notable feature of the Institute and in order to foster the translational path SR-Tiget has also established a number of development cores, including a Process Development Lab, a GLP (Good Laboratory Practices) Test Facility, a Vector Integration Core, a Bioinformatic Core, a GCLP (Good Clinical Laboratory Practices) Laboratory and a dedicated Clinical Trial Office.

In line with its mission, SR-Tiget is engaged in strategic alliances with pharma companies which are crucial to effectively develop the results of academic research into therapies available to patients. A milestone in this respect has been the marketing authorization granted in May 2016 by the European Commission to GSK for Strimvelis™, the first ex vivo gene therapy approved for the treatment of ADA-SCID, a rare immunodeficiency. To date more than 100 patients from all over the world have been treated with gene therapy protocols developed at SR-Tiget.

Istituto San Raffaele-Telethon per la Terapia Genica (SR-TIGET)

L'Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica (SR-Tiget) stato fondato nel 1995 a Milano come joint-venture fra la Fondazione Telethon e l'Istituto Scientifico San Raffaele con la missione di svolgere attività di ricerca all'avanguardia nel settore della terapia genica e cellulare e di tradurre i risultati ottenuti in avanzamenti terapeutici per le malattie genetiche. L'Istituto comprende 13 Unità di Ricerca Sperimentale e 2 Unità di Ricerca Clinica con competenze specifiche per lo svolgimento di sperimentazioni cliniche di terapie avanzate (ATMP - Advanced Therapy Medicinal Products), con uno staff di circa 220 persone provenienti da più di 10 paesi diversi.

Le attività di ricerca di SR-Tiget spaziano da ricerca di base a studi pre-clinici e studi clinici, e il portafoglio di terapie geniche e cellulari dell'Istituto abbraccia ora l'intero spettro delle fasi di sviluppo fino al mercato. L'integrazione tra ricerca clinica e ricerca di base è probabilmente la caratteristica più rilevante dell'Istituto e al fine di favorire questo percorso traslazionale, SR-Tiget si è dotato di una serie di Unità di Sviluppo, come il Process Development Lab, il Centro di Saggio GLP (Good Laboratory Practices), a l'Unità di Studio delle Integrazioni Vettoriali, l'Unità di Bioinformatica, a il Laboratorio GCLP (Good Clinical Laboratory Practices) e un Clinical Trial Office dedicato.

In linea con la sua missione, SR-Tiget è impegnato in alleanze strategiche con industrie

farmaceutiche, cruciali per sviluppare i risultati della ricerca accademica affinché diventino terapie disponibili per i pazienti. Una tappa fondamentale da questo punto di vista è stata l'autorizzazione all'immissione in commercio data nel maggio 2016 dalla Commissione Europea a GSK per Strimvelis™, la prima terapia genica ex vivo approvata per il trattamento di ADA-SCID, una rara immunodeficienza. Ad oggi più di 100 pazienti provenienti da tutto il mondo sono stati trattati con protocolli di terapia genica sviluppati presso SR-Tiget.

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.158

**L'UNIVERSO TELETHON: CHI SIAMO, COSA FACCIAMO E PER CHI LAVORIAMO**

Telethon F.\*

*Fondazione Telethon ~ Roma ~ Italy*

xx

L'Universo Telethon: chi siamo, cosa facciamo e per chi lavoriamo

Malattie di origine genetica

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.159

### LA RACCOLTA FONDI: COSA SI FA E CHI CI LAVORA

Fondazione T.\*

*Fondazione Telethon ~ Roma ~ Italy*

La raccolta fondi: cosa si fa e chi ci lavora

Malattia Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**



## Poster P.28.160

### I NOSTRI PRODOTTI DI PIAZZA

Fondazione T.\*

*Fondazione Telethon ~ Roma ~ Italy*

xx

I nostri prodotti di piazza

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.161

### IO ADOTTO IL FUTURO: IL PROGRAMMA DI DONAZIONE REGOLARE

Fondazione T.\*

*Fondazione Telethon ~ Roma ~ Italy*

Io adotto il futuro: il programma di donazione regolare

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.162

### VIAGGIO AL CENTRO DEI SOCIAL TELETHON

Fondazione T.\*

*Fondazione Telethon ~ Roma ~ Italy*

Viaggio al centro dei social Telethon

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.163

### MONITORING FONDAZIONE TELETHON'S RESEARCH INVESTMENT FOR A STRATEGIC PORTFOLIO MANAGEMENT

Monaco L., Baldessari D., Borrè A.\*

*Fondazione Telethon - Research Impact and Strategic Analysis – Centro Studi ~ Milan ~ Italy*

Research Impact and Strategic Analysis:

A dedicated unit aimed at measuring impact and enhancing visibility of Fondazione Telethon's research investment towards all stakeholders.

Monitoraggio dell'investimento in ricerca della Fondazione Telethon per una gestione strategica del portafoglio

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.164

### FROM THE DEFINITION OF RESEARCH INITIATIVES TO THE MONITORING OF FUNDED RESEARCH: THE TELETHON RESEARCH TEAM AT A GLANCE

Battaglia M.<sup>[1]</sup>, Ambrosini A.<sup>[2]</sup>, Zatti A.<sup>[2]</sup>, Rizzi E.\*<sup>[2]</sup>, Bruno E.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Fondazione Telethon - Head of Research ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Fondazione Telethon, Research ~ Milano ~ Italy

The Telethon Research Team is a dedicated unit that contributes to Telethon mission (i.e., fostering research leading to a cure for rare genetic diseases). The Team schedules and designs funding initiatives - in line with Telethon scientific strategic plan - contributes to the selection of research initiatives, and monitor research outputs. Final objective is to catalyse the best science towards patients' benefit.

Contact us at: telethonscience@telethon.it

Dalla definizione di iniziative di ricerca al monitoraggio della ricerca finanziata: il team di ricerca di Telethon a colpo d'occhio

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.165

### **BUSINESS DEVELOPMENT OFFICE: FROM THE LAB TO THE MARKET**

Merico A., Basilio F., Beltrami E., Sanavio B., Varani S.\*

*Fondazione Telethon, Business Development Office ~ Milano ~ Italy*

Universities and research institutions are fertile ground for inventions that change the way we live. Google, vitamin D-fortified milk, life-saving vaccinations, cancer treatments — they are just a few of the thousands of inventions that each year make the world a better place. But having an idea — even a revolutionary one — isn't enough. Universities and research institutions need help growing and advancing those discoveries to a final product or service — and that is where technology transfer fits in.

Malattie Genetiche

#### **Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

#### **Disease Name:**

Genetic Diseases

#### **Keywords:**

## Poster P.28.166

### **ALLIANCE MANAGEMENT & REGULATORY AFFAIRS - DRIVING INDUSTRIAL COLLABORATIONS TO SPEED UP THE DEVELOPMENT OF ADVANCED THERAPIES AND MAKE THEM AVAILABLE TO PATIENTS**

Gabaldo M.<sup>[1]</sup>, Farinelli G.\*<sup>[2]</sup>, Forni C.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Foundation, Head of Alliance Management and Regulatory Affairs ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Telethon Foundation, SR-TIGET Alliance Management and Regulatory Affairs Unit ~ Milan ~ Italy

Gestione Alleanze Industriali e Affari Regolatori: Gestione attiva delle collaborazioni industriali per accelerare lo sviluppo di terapie avanzate e renderle disponibili ai pazienti

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.167

### CLINICAL DEVELOPMENT AND JUST LIKE HOME - HIGH QUALITY SUPPORT FOR CLINICAL TRIALS AND PATIENTS

Zancan S.<sup>[1]</sup>, Corti A.<sup>[2]</sup>, Graziano A.<sup>[3]</sup>, Acerra C.<sup>[4]</sup>, Levi M.\*<sup>[5]</sup>

<sup>[1]</sup>Telethon Foundation, Head of Clinical Development Just Like Home ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Telethon Foundation, SR-Tiget Clinical Trial Unit ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>Telethon Foundation, Attivita' Specialistica di Eccellenza di Terapie Avanzate ~ Napoli ~ Italy, <sup>[4]</sup>Telethon Foundation, Unita' di Terapie Avanzate per le Malattie Oculari Ereditarie ~ Napoli ~ Italy, <sup>[5]</sup>Telethon Foundation, Just Like Home, Milano. ~ Milano ~ Italy

Clinical Development and Just Like Home TAKE CARE of clinical trials and patients respectively. CD guarantees high quality standard in clinical trial management, contributing to move projects from basic research to clinical research, providing end to end operational management of clinical studies and ensuring they are executed in compliance with clinical trial governance and regulatory requirements. JLH supports families and patients along their gene therapy pathway, offering a personalized organizational, logistics, administrative, emotional, cultural support. Both collaborates with the clinical teams and all move aligned and committed to offer high specialized treatment and personalized care to patients and families.

Sviluppo clinico e 'Come a casa' – un supporto di alta qualità per le sperimentazioni cliniche e per i pazienti

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**



## Poster P.28.168

### ADVANCING RARE GENETIC DISEASE RESEARCH AND THERAPY DEVELOPMENT VIA INTERNATIONAL PARTNERSHIPS AND PROJECTS

Benvenuti S.\*<sup>[1]</sup>, Wang C.M.<sup>[1]</sup>, Monaco L.<sup>[2]</sup>, Gabaldo M.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Global Partnerships & Projects - Fondazione Telethon ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Centro Studi - Fondazione Telethon ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>Regulatory & Alliance - Fondazione Telethon ~ Milano ~ Italy

Promuovere la ricerca sulle malattie genetiche rare e lo sviluppo di terapie attraverso partenariati e progetti internazionali

Malattie Genetiche

**Telethon Project (nr):**

Fondazione Telethon

**Disease Name:**

Genetic Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.169

### THE INTERNATIONAL RARE DISEASES RESEARCH CONSORTIUM (IRDIRC)

D'Angelo C.S.\*<sup>[1]</sup>, Julkowska D.<sup>[1]</sup>, Zanello G.<sup>[1]</sup>, Buchholz K.<sup>[2]</sup>, Wang C.M.<sup>[3]</sup>, Pearce D.<sup>[2]</sup>, Monaco L.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>IRDiRC Scientific Secretariat, Inserm ~ Paris ~ France, <sup>[2]</sup>Sanford Health ~ Sioux Falls, South Dakota ~ United States of America, <sup>[3]</sup>Fondazione Telethon ~ Milano ~ Italy

The International Rare Diseases Research Consortium (IRDiRC) unites national and international governmental and non-profit funding bodies, companies (including pharmaceutical and biotech enterprises), umbrella patient advocacy organizations, and scientific researchers to promote international collaboration and advance rare diseases research worldwide. Importantly, the coverage of the Consortium is global and involves stakeholders from Africa, Asia, Australia, North America, and Europe.

#### OUR VISION

Enable all people living with a rare disease to receive an accurate diagnosis, care, and available therapy within one year of coming to medical attention.

<http://www.irdirc.org/about-us/>

IRDiRC, il Consorzio Internazionale per la Ricerca sulle Malattie Rare

Malattie rare

#### Telethon Project (nr):

IRDiRC

#### Disease Name:

Rare Diseases

#### Keywords:

## Poster P.28.170

### THE EUROPEAN JOINT PROGRAMME ON RARE DISEASES (EJP RD)

D"Angelo C.S.\*, Julkowska D.

*EJP RD Coordination (Inserm) ~ Paris ~ France*

The European Joint Programme on Rare Diseases (EJP RD), launched in January 2019, brings together the resources in rare diseases (RD) research at the national and European level, involving funders, universities, research organisations and infrastructures, hospitals and patient organisations representing over 130 institutions across 35 countries. Jointly funded by the European Commission and Member States over five years, its purpose is to create a comprehensive and sustainable ecosystem for RD research. The two main objectives of EJP RD are to improve the integration, efficacy, production, and social impact of research on RDs, and secondly to implement an efficient model of financial support for all types of RDs research. In order to successfully achieve its goals, EJP RD is structured into 'pillars'. Pillar 1 focuses on the financial support through the implementation of transnational calls for research projects into RDs (including basic, translational, clinical, social and health economic research topics), and a Networking support scheme to encourage sharing of knowledge on RDs. Pillar 2 aims to build a comprehensive, FAIR-compliant virtual platform pooling data and resources (e.g., registries, biobanks, databases, bioinformatics tools) allowing for these resources to be findable online via a central access point and accessible to the whole RD community. Pillar 3 aims at capacity building and patient empowerment through the provision of periodic training activities to the RD community, and will deliver an EU-wide education programme on transversal RD research to all interested stakeholders, fully available online via an e-learning platform. Pillar 4 aims at accelerating the translation of research outputs by creating and continuously developing online self-help resources for benefit of any RD researcher involved in translational research. It will also implement the support for funded RD projects by identifying results that can be supported for further funding and development, thereby enhancing their chance of reaching clinical implementation. In 9 months of its existence, the EJP RD already demonstrates how the centralised collaboration between different stakeholders advances RD research for the benefit of patients.

EJP RD, il Programma Europeo Congiunto sulle Malattie Rare

Malattie rare

**Telethon Project (nr):**

EJP RD

**Disease Name:**

Rare Diseases

**Keywords:**

## Poster P.28.171

### ARISLA, THE ITALIAN FOUNDATION FOR ALS RESEARCH: MISSION, VISION, AND OUTCOMES OF TEN-YEAR INVESTMENT

Ravasi M.<sup>[1]</sup>, Guareschi S.<sup>[1]</sup>, Pozzi S.<sup>[2]</sup>, Munari L.M.<sup>[1]</sup>, Ambrosini A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Fondazione Italiana di ricerca per la SLA - Sclerosi Laterale Amiotrofica ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Fondazione Telethon, Research Impact and Strategic Analysis ~ Milan ~ Italy

AriSLA, the Italian Foundation for ALS research, was founded by AISLA Onlus (the main ALS Italian patient organisation), Fondazione Cariplo, Fondazione Telethon, and Fondazione Vialli e Mauro. Its mission is to support Italian excellent scientific research towards the cure of ALS. To reach this goal, AriSLA is working together with the Italian scientific community, playing the role of catalyst and driving force by providing economical, scientific and technical support.

Since its start in 2008, AriSLA adopted a rigorous peer review system to select the best research projects mainly through a bottom-up approach. Overall, AriSLA issued 11 calls for proposals, with an investment of more than 11 million euros. It funded 41 full grants, projects with a solid background and consistent preliminary data, and 31 pilot grants, 1-year projects with highly innovative hypotheses and few or not available preliminary data. These projects targeted basic research (52% of funds), preclinical and translational (27%), clinical (15%) and technological (6%) areas.

AriSLA performs a constant scientific and administrative monitoring of its funded projects. Moreover, it organises research training and promotes dissemination of scientific and lay information on ALS within the scientific community and the general public, respectively.

A recent research portfolio and benchmark analysis highlighted relevant outcomes of this regular investment and a number of “success stories”, which indicate the development of studies targeting hot topics in ALS research, their progress towards translation, and the strengthening of preclinical networks, also with international interactions.

Bibliometric analysis performed using the NIH Relative Citation Ratio (RCR) index (<https://icite.od.nih.gov/stats>) showed that the 63% of the publications derived from AriSLA funded projects falls in the top 50% of NIH RCR percentiles, with 23% in the top 20% (27 original papers and 13 reviews).

Regarding the pilot grant program, it attracted several investigators new to the ALS field (20 out of 31) and supported many investigators younger than 40 years of age (39%). Moreover, 11% of the pilot projects proved successful in subsequent AriSLA full grants.

Since 2010, AriSLA holds annual Scientific Congresses with AriSLA grantees and international invited speakers to update its stakeholders (patients and investigators) on the latest research developments and on the results derived from its funded projects; since 2015, some of these meetings have been co-organized with AISLA.

Conclusion: AriSLA independent peer review process proved effective to select excellent research, with high impact on ALS field, as demonstrated by the high RCR scores and the consolidated networking activity.

AriSLA, LA FONDAZIONE ITALIANA DI RICERCA PER LA SLA: MISSION, VISION, E RISULTATI DEI PRIMI 10 ANNI DI INVESTIMENTI

AriSLA, la Fondazione italiana per la ricerca sulla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), è stata fondata nel 2008 da AISLA Onlus, Fondazione Cariplo, Fondazione Telethon e Fondazione Vialli e Mauro per

supportare la ricerca scientifica italiana di eccellenza verso la cura della malattia. Per questo obiettivo, AriSLA collabora con la comunità scientifica italiana, svolgendo il ruolo di catalizzatore e motore della ricerca e fornendo il necessario supporto economico, scientifico e tecnico.

AriSLA da sempre ha adottato un rigoroso sistema di revisione in peer-review per selezionare i migliori progetti di ricerca. Complessivamente, AriSLA ha pubblicato 11 Bandi per progetti di ricerca, con un investimento di oltre 11 milioni di euro nella ricerca di base (52% dei fondi), preclinica e traslazionale (27%), clinica (15%) e tecnologica (6%). Ha finanziato 41 Full Grant, progetti con solido background e consistenti dati preliminari e 31 Pilot Grant, progetti di 1 anno per ricerca altamente innovativa e dati preliminari da consolidare o non disponibili.

AriSLA esegue un costante monitoraggio scientifico e amministrativo dei progetti finanziati; organizza incontri di formazione e promuove la diffusione di informazioni scientifiche sulla SLA sia per la comunità scientifica, sia per il pubblico di non addetti ai lavori.

Una recente analisi del "portfolio" AriSLA ha messo in evidenza alcuni importanti risultati di questo investimento regolare e una serie di "storie di successo", che dimostrano lo sviluppo di studi che affrontano temi rilevanti per la ricerca sulla SLA, i loro progressi verso una ricerca traslazionale ed il rafforzamento delle reti precliniche, anche attraverso collaborazioni internazionali.

L'analisi bibliometrica eseguita utilizzando l'indice NIH "Relative Citation Ratio" (RCR) (<https://icite.od.nih.gov/stats>) ha mostrato che il 63% delle pubblicazioni derivate da progetti finanziati da AriSLA rientra nel top 50% dei percentili NIH ed il 23% appartiene al top 20% (27 articoli originali e 13 review).

Il programma dei Pilot Grant ha attirato numerosi ricercatori nuovi nel campo della SLA (20 su 31), sostenendo molti ricercatori di età inferiore ai 40 anni (39%). Inoltre, l'11% dei progetti pilota ha avuto successo nell'ottenimento di un successivo Full Grant AriSLA.

Dal 2010, AriSLA organizza annualmente un Congresso Scientifico per aggiornare i propri stakeholder (pazienti e ricercatori) sugli ultimi sviluppi della ricerca e sui risultati derivati dai progetti finanziati; dal 2015 alcuni di questi Congressi sono stati organizzati in collaborazione con AISLA.

Conclusione: il processo di revisione in peer-review adottato da AriSLA si è dimostrato efficace per selezionare ricerche eccellenti, con un forte impatto nel campo della SLA, come dimostrato dall'analisi bibliometrica e dal consolidamento del network di ricerca.

Sclerosi Laterale Amiotrofica

**Telethon Project (nr):**

Arisla

**Disease Name:**

Amyotrophic Lateral Sclerosis

**Keywords:**



## Table of Contents

<b>01_Genetic muscular disease\Muscular dystrophies</b>	<b>1</b>
A NATION-WIDE ITALIAN REGISTRY FOR PATIENTS WITH MUSCULAR DYSTROPHIES AND MYOPATHIES	2
UPDATE ON THE BON-DMD (GUP11011) STUDY: THE BIOCHEMICAL MARKERS	6
DETRIMENTAL ROLE OF COMPLEMENT C1/WNT AXIS IN DYSTROPHIC MUSCLE	9
IDENTIFICATION OF A TWO NOVEL SUBPOPULATIONS OF SATELLITE CELLS WITH DIFFERENT KINETICS OF ACTIVATION	11
A POSSIBLE STRATEGY TO INDUCE EXON 45 SKIPPING IN DMD-D44 PATIENTS THROUGH THE MODULATION OF CELF2A SPLICING FACTOR	13
EXTRACELLULAR ATP AND T REGULATORY CELLS: NEW THERAPEUTICS TARGETS IN ALPHA-SARCOGLYCAN DEFICIENT MUSCULAR DYSTROPHY (LGMD2D)	15
MODULATION OF THE CYCLIN INHIBITOR P27 TO AMELIORATE MEROSIN DEFICIENT CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY (MDC1A)	18
USEFUL: USER- CENTRED ASSISTIVE SYSTEM FOR ARM FUNCTIONS IN NEUROMUSCULAR SUBJECTS	20
GENE EDITING IN MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1: ASSESSMENT OF EFFICIENCY, SAFETY AND THERAPEUTIC EFFECT OF CTG-REPEAT DELETION IN A MOUSE MODEL OF DISEASE	23
SMALL MOLECULES TO RESCUE FOLDING-DEFECTIVE SARCOGLYCANS: IN VIVO ASSESSMENT OF NOVEL THERAPEUTIC STRATEGIES	25
SMN-PRIMED RIBOSOMES MODULATE THE TRANSLATION OF TRANSCRIPTS RELATED TO SPINAL MUSCULAR ATROPHY	28
A MITOCHONDRIAL THERAPY FOR MUSCULAR DYSTROPHIES	30
SPERMIDINE AS NEW CANDIDATE FOR THE TREATMENT OF COL6 MYOPATHIES (SPECTRE-COL6)	32
<b>02_Genetic muscular disease\Myopathies and cardiomyopathies</b>	<b>34</b>
REMODELING OF MITOCHONDRIAL FUNCTION AND GENE EXPRESSION IN CORE MYOPATHY PATIENTS	35
A NOVEL IN VITRO DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY CARDIOMYOPATHY MODEL: HUMAN IPSC-DERIVED CARDIOMYOCYTES FOR MECHANISTIC STUDIES	37
DEVELOPING TOOLS FOR TRIAL READINESS IN PRIMARY MITOCHONDRIAL MYOPATHIES OF THE ADULTHOOD	39
CLINICAL, MOLECULAR AND PATHOGENETIC STUDIES OF NEUTRAL LIPID STORAGE DISEASE (NLSD)	42
STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY (SOCE): ROLE IN SKELETAL MUSCLE FUNCTION AND DISEASE.	45
<b>03_Genetic muscular disease\Myotonic disorders</b>	<b>48</b>
SKELETAL MUSCLE AND CIRCULATING MICRORNAS IN MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1	49

<b>04_Genetic neurological disorder\Neuromuscular diseases</b>	<b>52</b>
MODULATING NEUREGULIN-1 SIGNALS TO TREAT HEREDITARY DEMYELINATING NEUROPATHIES	53
GENE THERAPY AND LONG TERM EVALUATION OF DIFFERENT DIETARY REGIMENS IN A GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE III KO MOUSE MODEL	56
MITMED CONSORTIUM: FROM THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NUCLEAR GENES RESPONSIBLE FOR HUMAN MITOCHONDRIAL DISORDERS TOWARDS POTENTIAL THERAPEUTIC APPROACHES IN EXPERIMENTAL MODELS	59
CLINICAL EFFICACY OF NIV AND MODAFINIL ON EXCESSIVE DAYTIME SLEEPINESS: LESSONS LEARNED FROM A MULTICENTER, RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED CLINICAL TRIAL IN DM1	61
PRE-CLINICAL IDENTIFICATION OF DRUGS TARGETING POLG DISORDERS BY USING A ZEBRAFISH/YEAST TRANS-SPECIES APPROACH (ZIPPY)	63
REGISTRY FOR TRIAL READINESS IN SPINAL AND BULBAR MUSCLE ATROPHY	65
PHOSPHORYLATION-MEDIATED CHANGES OF ANDROGEN RECEPTOR STRUCTURE AND FUNCTION IN SPINAL AND BULBAR MUSCULAR ATROPHY PATHOGENESIS	68
DEVELOPMENT OF A PREDICTIVE BODY FAT EQUATION FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY TYPE I CHILDREN	70
IDENTIFICATION OF NEW DRUGGABLE TARGETS AND POTENTIAL THERAPEUTIC COMPOUNDS FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY, USING A C.ELEGANS MODEL OF NEURODEGENERATION	73
CELL PENETRATING PEPTIDE-CONJUGATED MORPHOLINO FOR TREATMENT OF SMA SYMPTOMATIC CASES	76
ANTHROPOMETRIC STANDARDS IN NAÏVE PATIENTS WITH SPINAL MUSCULAR ATROPHY TYPE 1.	78
<b>05_Genetic neurological disorder\Polyneuropathies</b>	<b>81</b>
KNOCKDOWN AND REPLACEMENT OF MFN2 FOR TREATMENT OF DOMINANTLY INHERITED PERIPHERAL NEUROPATHY CMT2A PATIENTS	82
TTR-FAP ITALIAN REGISTRY: A COLLABORATIVE NETWORK FOR DEFINITION OF NATURAL HISTORY, PSYCHOSOCIAL BURDEN, STANDARDS OF CARE AND CLINICAL TRIALS	84
<b>06_Genetic neurological disorder</b>	<b>87</b>
FINDING NEW TARGETS TO COUNTERACT BRAIN PROGENITOR CELLS DYSREGULATION IN AGC1 DEFICIENCY HYPOMYELINATION: A MULTIDISCIPLINARY APPROACH.	88
THE AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME – FROM NUCLEIC ACID SENSING TO DISEASE MODELLING	91
IMPROVING DEVELOPMENTAL TRAJECTORIES IN 22Q11.2 DELETION SYNDROME BY OXYTOCIN: FOCUS ON ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS.	93
ENHANCED THALAMOCORTICAL SYNAPTIC TRANSMISSION AND DYSREGULATION OF THE EXCITATORY-INHIBITORY BALANCE AT THE THALAMOCORTICAL FEED-FORWARD INHIBITORY MICROCIRCUIT IN A MOUSE MODEL OF FAMILIAL HEMIPLEGIC MIGRAINE	95



A NOVEL COMPREHENSIVE STRATEGY FOR THE STUDY OF THE MOLECULAR BASIS OF FAMILIAL HEMIPLEGIC MIGRAINE 3	98
ROLE OF ER-PHAGY IN HEREDITARY SENSORY AXONOPATHIES	101
TRPML1 LINKS LYSOSOMAL CALCIUM TO AUTOPHAGY INITIATION	103
<b>07_Genetic neurological disorder\Ataxias</b>	<b>105</b>
EXCITATORY/INHIBITORY UNBALANCE IN ATAXIA TELANGIECTASIA AND NEW THERAPEUTICAL INTERVENTIONS	106
REGULATION OF ALTERNATIVE SPLICING OF VOLTAGE-GATED CA <sup>2+</sup> CHANNELS BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING AS POTENTIAL GENETIC THERAPY FOR EPISODIC ATAXIA TYPE 2	109
RNA THERAPEUTICS FOR FRIEDREICH'S ATAXIA	111
CLINICAL, GENETIC AND FUNCTIONAL STUDIES ON JOUBERT SYNDROME AND RELATED DISORDERS: A MODEL TO UNDERSTAND THE COMPLEXITY OF CILIOPATHIES	113
<b>08_Genetic neurological disorder\Epilepsy and Seizures</b>	<b>116</b>
DELINEATING THE MOLECULAR PATHWAY AND PATHOGENIC MECHANISM UNDERLYING AUTOSOMAL DOMINANT LATERAL TEMPORAL EPILEPSY (ADLTE)	117
PROTEIN SUBSTITUTION THERAPY: A PROMISING TREATMENT FOR CDKL5 DEFICIENCY DISORDER	120
TOWARD GENE THERAPY FOR DRAVET SYNDROME: UNCOVERING DYNAMICS OF REVERSIBILITY AND MECHANISMS OF SCN1A GENE MODULATION	122
RESCUING EPILEPSY ASSOCIATED WITH SYN1 AND SCN1A GENE MUTATIONS BY INHIBITING EEF2K/EEF2 PATHWAY	124
SOLVING THE PUZZLE OF PROTOCADHERIN-19 MOSAICISM TO UNDERSTAND THE PATHOPHYSIOLOGY OF PCDH19 FEMALE EPILEPSY (PCDH19-FE)	126
DISSECTING THE ARISTALESS-RELATED HOMEBOX EPILEPSY PATH TO FIND DRUGGABLE TARGET MOLECULES	129
GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS, NOVEL PATHOGENETIC MECHANISMS, AND PILOT CLINICAL STUDIES IN NEONATAL EPILEPSIES ASSOCIATED TO MUTATIONS IN THE KCNQ2/3 POTASSIUM CHANNEL GENES	132
INTERACTION OF PRRT2 WITH SODIUM CHANNELS: PATHOGENETIC BASIS AND NEW TARGETS FOR THE CURE OF PRRT2-ASSOCIATED PAROXYSMAL DISORDERS	135
<b>09_Genetic neurological disorder\Intellectual Disabilities</b>	<b>138</b>
NLG3 SHAPES EXCITATION/INHIBITION RATIO IN NEURONAL CIRCUITS OF ASD MURINE MODELS: IMPLICATIONS OF THE CA2 HIPPOCAMPAL CIRCUIT IN SOCIAL DEFICITS	139
ROLE OF INTRACELLULAR CHLORIDE ACCUMULATION IN DOWN SYNDROME PHYSIOPATHOLOGY IN MICE RUOLO DELLA ACCUMULAZIONE DI CLORO INTRACELLULARE NELLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DI DOWN.	141

NEUROTROPHIC-MIMETIC STRATEGY TO RESCUE SYNAPTIC PLASTICITY AND COGNITIVE FUNCTIONS IN A MOUSE MODEL OF DOWN SYNDROME	144
DROSOPHILA MELANOGASTER AS A MODEL TO STUDY THE ROLE OF FMRP PROTEIN, INVOLVED IN THE FRAGILE-X SYNDROME, IN THE PIRNA-MEDIATED GENOME STABILITY	146
SETD5 REGULATES CHROMATIN METHYLATION STATE AND PRESERVES GLOBAL TRANSCRIPTIONAL FIDELITY DURING BRAIN DEVELOPMENT AND NEURONAL WIRING	148
INTRACELLULAR CHLORIDE DYNAMICS IN AUTISTIC BRAIN: A BETTER UNDERSTANDING IS NEEDED FOR TAILORED CURES.	150
NEURONAL DYSFUNCTIONS UNDERLYING PHELAN-MCDERMID SYNDROME AND THEIRS RESCUE BY GENETIC AND PHARMACOLOGICAL MODULATION OF MGLU5 SIGNALING	152
EXPLOITING WHOLE-BRAIN STRATEGIES OF GENE THERAPY AND NOVEL THERAPEUTIC TARGETS IN RETT SYNDROME MOUSE MODELS	154
ALTERED L-TYPE CHANNEL GATING, ACTION POTENTIAL FIRING AND EXCITATORY/INHIBITORY SYNAPTIC RESPONSES IN HIPPOCAMPAL NEURONS OF THE AUTISTIC TIMOTHY SYNDROME TYPE-2 MOUSE	156
MECHANISTIC DISSECTION OF POLYCOMB-DEPENDENT DYSREGULATION IN WEAVER SYNDROME NEURAL LINEAGES	159
SPOTLIGHT ON LATERAL HABENULA (LHB) FUNCTION IN TETRASPANIN7 (TSPAN7) KNOCK-OUT MICE	161
<b>10_Genetic neurological disorder\Neurodegenerative diseases</b>	<b>163</b>
ALTERATION OF LYSOSOMES AND OF LYSOSOMAL ACTIVITY IN CHARCOT-MARIE-TOOTH 2B PERIPHERAL NEUROPATHY	164
FULL ATOMISTIC MODEL OF PRION STRUCTURE AND CONVERSION	167
MITOCHONDRIAL CA <sup>2+</sup> UPTAKE IN THE PATHOGENESIS OF FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE	169
DEVELOPMENT OF EXON SPECIFIC U1 SNRNA-BASED THERAPY FOR FAMILIAL DYSAUTONOMIA	171
FATAL FAMILIAL INSOMNIA: PREVENTIVE TREATMENT WITH DOXYCYCLINE OF AT RISK INDIVIDUALS	173
NEUROSERPIN MISFOLDING AND FENIB NEURODEGENERATION: MECHANISM AND INHIBITION PROCESSES	176
LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS (LSD) - MODELING THE DISEASE COMPLEXITY TO REFINE GENE/CELL THERAPY TREATMENT STRATEGIES	178
MENINGES AS AN OVERLOOKED PHARMACOLOGICAL TARGET FOR GLOBOID CELL LEUKODYSTROPHY	181
PLASMALOGEN-BASED THERAPEUTIC STRATEGY FOR THE TREATMENT OF HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA	183
SLUGGISH MITOCHONDRIAL FLICKERING AT THE BASIS OF HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA (SPG7)	185
TARGETING NEURONS WITH CHOLESTEROL. HOW CAN IT CHANGE THE FUTURE OF HD PATIENTS	187
DISSECTING THE MOLECULAR FUNCTION OF MUTANT HUNTINGTIN WITH STEM CELLS	189

MIR-181A AND MIR-181B DOWNREGULATION AMELIORATES MITOCHONDRIAL-ASSOCIATED NEURODEGENERATION BY ENHANCING MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND MITOPHAGY	191
DISEASE' MECHANISMS AND PHARMACOLOGICAL TARGETING OF BEHAVIORAL SYMPTOMS IN SANFILIPPO SYNDROME.	193
LYSOSOMAL AMYLOID DEPOSITION IMPAIRS AUTOPHAGY AND IS A DRUGGABLE TARGET FOR THE NEURODEGENERATION IN LYSOSOMAL STORAGE DISEASES	195
TARGETING LIPIDS IN CLN8-ASSOCIATED NCL DISEASES: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INTERACTION OF CLN8 WITH VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN-ASSOCIATED PROTEIN A (VAPA), AND GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS	197
AGE-DEPENDENT BEHAVIORAL DEFICITS AND PROTEIN AGGREGATION IN LRRK2 HG2019S MICE	200
IMPLEMENTATION OF HUMAN NEURONAL CULTURES AND MOUSE MODELS OF PANTOTHENATE KINASE 2 DEFICIENCY TO INVESTIGATE PATHOGENIC MECHANISMS OF IRON-RELATED NEURODEGENERATION AND EVALUATE COENZYME A THERAPEUTIC EFFICACY	202
A NEW EXPLOITATION OF A PORPHYRIN WITH ANTI-PRION PROPERTIES: CHARACTERIZATION OF THE MECHANISM OF ACTION AND PRECLINICAL STUDIES IN MOUSE MODELS OF GENETIC PRION DISEASE	205
ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION AS A NOVEL STRATEGY TO BLOCK TOXICITY OF THE MUTANT ANDROGEN RECEPTOR IN SBMA	207
MOTOR NEURON DEGENERATION IN SPINAL AND BULBAR MUSCULAR ATROPHY: MOLECULAR APPROACHES TO COUNTERACT MUTANT ANDROGEN RECEPTOR NEUROTOXICITY	210
TRANSLATING MOLECULAR PATHOLOGY INTO A THERAPEUTIC STRATEGY IN SCA38, A NEWLY IDENTIFIED FORM OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA.	214
<b>11_Inborn errors of metabolism</b>	<b>217</b>
OXIDATIVE LIPIDOMICS IN BARTH SYNDROME	218
CREATINE DEFICIENCY SYNDROME: NOVEL INSIGHT INTO BRAIN FUNCTION AND THERAPEUTIC STRATEGIES	221
CIRCULATING ANTI-GB3 ANTIBODY AS BIOMARKER OF MYOCARDIAL INFLAMMATION IN PATIENTS WITH FABRY DISEASE CARDIOMYOPATHY	226
METABOLIC REPROGRAMMING OF T REGULATORY CELLS AS THERAPEUTIC TOOL TO DAMPEN THE IMMUNO-INFLAMMATORY RESPONSE ASSOCIATED TO ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS AFFECTED BY FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA	228
EXPLOITING TARGETED EPIGENOME EDITING FOR THERAPEUTIC APPLICATIONS AND TO UNCOVER NOVEL GENE REPRESSION MECHANISMS.	231
INCREASED AUTOIMMUNITY RISK IN GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE 1B IS ASSOCIATED WITH ALTERATION OF REGULATORY T CELLS	233
EXPLOITING A BACTERIAL REDOX CYCLER AGAINST MITOCHONDRIAL DISEASE LINKED TO RESPIRATORY COMPLEX III DYSFUNCTION	236
NOVEL THERAPEUTIC APPROACHES FOR COENZYME Q DEFICIENCY	238

HEMATOPOIETIC STEM CELL GENE THERAPY FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I, HURLER VARIANT (MPS-IH).	241
IN VIVO INDUCTION OF AG-SPECIFIC TOLERANCE BY HEPATOCYTE-TARGETED GENE TRANSFER.	243
POMPE DISEASE, NEW APPROACHES TO ADDRESS UNMET NEEDS	245
NOVEL THERAPIES FOR UREA CYCLE DISORDERS.	248
INTEGRATED APPROACHES TO GENE THERAPY OF WILSON DISEASE	250
<b>12_Chromosomal anomaly</b>	<b>252</b>
ANALYTICAL METHOD: VALIDATION AND ANALYSES OF STUDY SAMPLES	253
<b>13_Genetic bone disease</b>	<b>256</b>
AUTOSOMAL DOMINANT OSTEOPEITROSIS TYPE 2 (ADO2): CLOSE TO THE CURE. WHAT DO WE MISS?	257
EXPANDED CIRCULATING HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS AS A NOVEL CELL SOURCE FOR THE TREATMENT OF AUTOSOMAL RECESSIVE OSTEOPEITROSIS	260
EMERGING ROLES OF ER-PHAGY IN MAINTAINING CELLULAR FITNESS AND FUNCTION IN CHONDROCYTES	263
PROTEOSTASIS IN THE EARLY SECRETORY COMPARTMENT AS A PATHOGENETIC MECHANISM AND THERAPEUTIC TARGET: ALTERED COLLAGEN BIOSYNTHESIS AND BONE DEVELOPMENT IN THE ABSENCE OF ERP44, A ZINC-REGULATED CHAPERONE	266
FIBROUS DYSPLASIA: A ROADMAP TO TREATMENT ENABLED BY DISCOVERY OF UNPREDICTED MECHANISMS IN FIRST-IN CLASS MOUSE MODELS.	268
TMEM16E / ANO5 MUTATIONS RELATED TO BONE DYSPLASIA OR MUSCULAR DYSTROPHY CAUSE OPPOSITE EFFECTS ON LIPID SCRAMBLING	271
OSTEOPEITROSIS AND BARTTER SYNDROME: STRUCTURAL-FUNCTIONAL INVESTIGATION OF MUTATIONS CAUSING DISEASES	273
<b>14_Genetic cardiac disease</b>	<b>275</b>
OXIDIZED LDL/CD36/PPAR $\gamma$ CIRCUITRY IS A TRIGGER OF ADIPOGENESIS IN ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY	276
<b>15_Genetic developmental defect during embryogenesis</b>	<b>279</b>
MUTATIONS OF THE SUBCORTICAL MATERNAL COMPLEX AND IMPRINTING DISORDERS: HOW THE GENOTYPE INTERACTS WITH THE EPIGENOTYPE	280
A NOVEL SEMA3G MUTATION IN TWO SIBLINGS AFFECTED BY HYPOGONADISM, DEVELOPMENTAL DELAY AND FACIAL MALFORMATIONS	283
<b>16_Genetic eye disease</b>	<b>285</b>
INHIBITION OF AUTOPHAGY CURTAILS VISUAL LOSS IN A MODEL OF AUTOSOMAL DOMINANT OPTIC ATROPHY	286

CONE DYSTROPHIES AND RETINAL DEGENERATION FROM PROTEIN STRUCTURES TO BIOLOGICAL NETWORKS: TOWARD THE DESIGN OF THERAPEUTIC MOLECULES.	288
ENZYMATIC PHENOTYPE AND RESPONSE TO VITAMIN B6 OF ORNITHINE AMINOTRANSFERASE VARIANTS ASSOCIATED WITH GYRATE ATROPHY OF THE CHOROID AND RETINA	291
MODULATION OF MICRORNA EXPRESSION: A NEW THERAPEUTIC AVENUE FOR INHERITED RETINAL DISEASE?	293
THERAPEUTIC TARGETING OF MIR-211/EZRIN AXIS PREVENTS RETINAL DEGENERATION IN THE RHOP23H MOUSE MODEL	295
PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR (PEDF) PEPTIDES AS THERAPEUTIC AGENTS FOR INHERITED RETINAL DEGENERATION	297
INTEIN-MEDIATED PROTEIN TRANS-SPLICING EXPANDS ADENO-ASSOCIATED VIRUS TRANSFER CAPACITY IN THE RETINA	299
<b>17_Genetic gastroenterological disease</b>	<b>301</b>
DISCOVERING MOLECULAR DEFECTS OF SEVERE GUT DYSFUNCTION: NEW ABNORMALITIES UNDERLYING CHRONIC INTESTINAL PSEUDO-OBSTRUCTION (CIPO)	302
<b>18_Genetic hematologic disease</b>	<b>305</b>
DEFINING HEMATOPOIESIS IN BETA-THALASSEMIA PATIENTS AND AFTER GENE THERAPY	306
REGULATION OF HEMATOPOIESIS IN NORMAL AND STRESSED CONDITIONS	308
GENE THERAPY FOR THE TREATMENT OF ADULT AND PEDIATRIC PATIENTS AFFECTED BY TRANSFUSION DEPENDENT BETA-THALASSEMIA	310
DISSECTING CELL SENESCENCE PROGRAMS IN THE HEMATOPOIETIC COMPARTMENT	313
LIVER-DIRECTED GENE THERAPY WITH LENTIVIRAL VECTORS ACHIEVE NORMAL LEVELS OF CLOTTING FACTOR VIII AND IX IN NON-HUMAN PRIMATES	315
CONVENTIONAL DCS AND ENDOGENOUS TRYPTOPHAN DERIVATIVES PREVENT THE DEVELOPMENT OF ANTI-FVIII ANTIBODIES IN HEMOPHILIA A MODEL	317
FROM COAGULATION TO ANGIOGENESIS: NEW ROLES FOR FVIII IN ENDOTHELIAL FUNCTIONALITY	319
GENOMIC MECHANISMS OF HUMAN GRANULOPOIESIS: IMPLICATIONS FOR BONE MARROW RECONSTITUTION AFTER GENE THERAPY	322
MESODERMAL RETINOIC ACID SIGNALING REGULATES THE SPECIFICATION OF HUMAN DEFINITIVE HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS	324
MODELLING THE EMBRYONIC ORIGIN OF OMENN SYNDROME AUTO-REACTIVE T-CELLS	326
EX VIVO EXPANSION OF GENETICALLY-ENGINEERED HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS FROM MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD	329
GENE CORRECTION OF CD40LG GENE IN T CELLS AND HSPC FOR THE TREATMENT OF X-LINKED HYPER-IGM IMMUNODEFICIENCY	331

<b>19_Genetic hepatic disease</b>	<b>333</b>
IDENTIFICATION AND THERAPEUTIC TARGETING OF NEW MOLECULAR PATHWAYS IN WILSON DISEASE	334
<b>20_Genetic immune disease</b>	<b>337</b>
MODULATION OF LINE-1 RETROTRANSPOSITION BY AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME-RELATED GENES.	338
GENE THERAPY AND PATHOGENESIS OF CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE	342
SCREENING CVID PATIENTS WITH T CELL DEFECTS FOR PATHOGENIC VARIANTS OF CILIARY PROTEINS IDENTIFIES CCDC28 AS NEW PLAYER IN IMMUNE SYNAPSE ASSEMBLY	345
MECHANISMS OF ENHANCED HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSDUCTION AND NUCLEIC ACID SENSING	348
ADVANCED GENETIC ENGINEERING OF HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS	351
REGULATION OF PATHOGEN-SPECIFIC T-CELL RESPONSES IN PATIENTS WITH HYPER-IGE SYNDROME (HIES)	354
EXPLORING THE PATHOGENETIC BASIS OF ICF SYNDROME WITH HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS	356
IDENTIFICATION AND THERAPY OF COMBINED IMMUNODEFICIENCIES AND ADENOSINE DEAMINASE 2 DEFICIENCY	359
TARGETED GENOME EDITING IN RECOMBINATION ACTIVATING GENE 1 (RAG1): A PRECISE CORRECTION OF THE GENETIC DEFECT IN HUMAN SCID	362
NOVEL STRATEGIES TO GENERATE TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS FOR ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY	365
HSPC BIOLOGY: IN VIVO CLONAL TRACKING AND LINEAGE MODELING	367
SAP AND DIACYLGLYCEROL KINASE A RECIPROCALLY REGULATE TCR SIGNALLING	370
<b>21_Genetic renal disease</b>	<b>373</b>
MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENESIS AND PRECLINICAL TREATMENT IN RENAL DISORDERS ASSOCIATED WITH UROMODULIN MUTATIONS	374
UNRAVELLING THE ROLE OF PAX2 MUTATIONS IN HUMAN FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS	377
DECODING AND TARGETING THE MTORC1-TFEB AXIS IN GENETIC DISEASES	379
<b>22_Genetic respiratory disease</b>	<b>381</b>
COMPUTATIONAL AND QUANTITATIVE BIOLOGY IN RARE GENETIC DISEASES.	382
<b>23_Genetic skin disease</b>	<b>385</b>

A FUNCTIONAL GENOMICS FRAMEWORK TO INVESTIGATE THE MOLECULAR BASES OF RARE GENETIC DISEASES	386
THERAPEUTIC STRATEGIES TO RESCUE SKIN EROSIONS IN AEC SYNDROME.	388
A THERAPEUTIC APPROACH FOR RARE GENODERMATOSES CAUSED BY ABERRANT CONNEXIN HEMICHANNELS	391
<b>24_Genetic systemic or rheumatologic disease</b>	<b>393</b>
NEW PHARMACOLOGICAL TARGETS AND STRATEGIES IN AGEL AMYLOIDOSIS	394
THE ROLE OF TELOMERIC DILNCRNAS AND DDRNAS IN THE HUTCHINSON–GILFORD PROGERIA SYNDROME	397
IDENTIFICATION OF CORRECTORS OF LOWE SYNDROME	400
<b>25_Genetic vascular disease</b>	<b>402</b>
ENDOTHELIAL CELL CLONAL EXPANSION IN THE DEVELOPMENT OF CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATIONS	403
CROSSTALK BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN THE PATHOGENESIS OF CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION (CCM) DISEASE: FROM THE IDENTIFICATION OF BASIC MECHANISMS TO THE DEVELOPMENT OF THERAPEUTIC STRATEGIES	407
<b>26_Undiagnosed diseases with proven genetic origin</b>	<b>411</b>
THREE YEARS OF THE TELETHON UNDIAGNOSED DISEASES PROGRAM: DATA AND FINDINGS	412
<b>27_Genetic Biobanks</b>	<b>415</b>
TELETHON NETWORK OF GENETIC BIOBANKS	416
<b>28_Institutional posters</b>	<b>419</b>
TIGEM INSTITUTE OVERVIEW	420
SR-TIGET INSTITUTE OVERVIEW	421
L’UNIVERSO TELETHON: CHI SIAMO, COSA FACCIAMO E PER CHI LAVORIAMO	423
LA RACCOLTA FONDI: COSA SI FA E CHI CI LAVORA	424
I NOSTRI PRODOTTI DI PIAZZA	425
IO ADOTTO IL FUTURO: IL PROGRAMMA DI DONAZIONE REGOLARE	426
VIAGGIO AL CENTRO DEI SOCIAL TELETHON	427
MONITORING FONDAZIONE TELETHON’S RESEARCH INVESTMENT FOR A STRATEGIC PORTFOLIO MANAGEMENT	428
FROM THE DEFINITION OF RESEARCH INITIATIVES TO THE MONITORING OF FUNDED RESEARCH: THE TELETHON RESEARCH TEAM AT A GLANCE	429
BUSINESS DEVELOPMENT OFFICE: FROM THE LAB TO THE MARKET	430

ALLIANCE MANAGEMENT & REGULATORY AFFAIRS - DRIVING INDUSTRIAL COLLABORATIONS TO SPEED UP THE DEVELOPMENT OF ADVANCED THERAPIES AND MAKE THEM AVAILABLE TO PATIENTS	431
CLINICAL DEVELOPMENT AND JUST LIKE HOME - HIGH QUALITY SUPPORT FOR CLINICAL TRIALS AND PATIENTS	432
ADVANCING RARE GENETIC DISEASE RESEARCH AND THERAPY DEVELOPMENT VIA INTERNATIONAL PARTNERSHIPS AND PROJECTS	433
THE INTERNATIONAL RARE DISEASES RESEARCH CONSORTIUM (IRDIRC)	434
THE EUROPEAN JOINT PROGRAMME ON RARE DISEASES (EJP RD)	435
ARISLA, THE ITALIAN FOUNDATION FOR ALS RESEARCH: MISSION, VISION, AND OUTCOMES OF TEN-YEAR INVESTMENT	436



## Authors' Index (page numbers)

**A**

Acampora D. ....	129
Accordini S. ....	9
Acerra C. ....	432
Acosta M. ....	238
Acquati S. ....	241
Agosto C. ....	70; 78
Aguado J. ....	397
Aiuti A. ....	241; 260; 306; 310; 322; 342; 348; 359; 367
Albanese Y. ....	173
Albano L. ....	331; 351
Albert S. ....	299
Alberti M. ....	141; 144
Albertini P. ....	253; 342
Alessio Z. ....	148
Altucci L. ....	129
Alves M. ....	169
Alvino F. ....	193
Amabile A. ....	351
Ambrosini A. ....	429; 436
Ambrosino P. ....	132
Amodio G. ....	365
Andolfi G. ....	365
Andreazzoli M. ....	148
Andreini D. ....	276
Anelli T. ....	266
Angelini Claudia ....	356
Angelini Corrado ....	42
Angiolillo S. ....	189
Annoni A. ....	243; 315; 331; 365
Annunziata P. ....	386
Antognelli C. ....	407
Antonietti A. ....	20

Antonini D. ....	388
Antonini F. ....	15
Antonucci F. ....	106
Aprile A. ....	308
Aquino D. ....	65
Arca M. ....	42
Argenton F. ....	59; 63
Arnaboldi L. ....	276
Artuso V. ....	173
Assunto A. ....	233
Asteriti S. ....	288
Auricchio A. ....	299
Avancini D. ....	365
Ayuso E. ....	315

**B**

Baccega T. ....	231
Bachi A. ....	348
Bagnati R. ....	187
Baldanzi G. ....	370
Baldari C.T. ....	345
Baldassari S. ....	109; 117
Baldelli P. ....	135
Baldessari D. ....	428
Baldoli C. ....	241
Balducci V. ....	37
Ballabio A. ....	379
Balzac F. ....	156
Banfi Sandro ....	191; 293
Banfi Stefano ....	205
Baranello G. ....	70; 78
Baratto S. ....	15
Barbato S. ....	191
Barberis A. ....	139

Barbiera G.....	322	Bentivoglio M.....	88
Barbieri R.....	98	Benvenuti S.....	433
Barbiroli A.....	394	Benzi A.....	15
Barcella M.....	260; 329; 367	Beretta Stefania.....	124
Barolomeo R.....	263	Beretta Stefano.....	308; 329; 351
Baroncelli L.....	221	Bernabò P.....	28
Barresi S.....	322	Bernardi P.....	30; 185; 238
Baruffini E.....	59; 63	Bernardo M.E.....	241; 367
Baruteau J.....	248	Bersani M.....	76
Barzaghi F.....	359	Bertelli S.....	98
Baschiera E.....	238	Bertini Enrico.....	113
Baselli L.....	354	Bertini Enrico Silvio.....	70; 78
Basilico F.....	430	Bertoli S.....	70; 78
Bassani S.....	126	Bett G.C.L.....	156
Bassano M.....	70; 78	Bianchessi V.....	322
Basso D.....	32	Bianchi M.L.....	6
Basso M.....	68; 214	Bianco F.....	302
Basso--Ricci L.....	260; 322; 342; 359; 367	Biasini E.....	167
Battaglia M.....	429	Bifari F.....	181
Battezzati A.....	70; 78	Biffi E.....	20
Beamer E.....	169	Biffi M.....	315
Becchetti A.....	185	Biressi S.....	9; 11
Becerra P.....	297	Biolini G.....	187
Bedogni F.....	283	Bisogni G.....	65
Bedogni G.....	78	Bitan G.....	195
Beffagna G.....	63	Boccaccio A.....	271
Belfiori G.....	322	Boeckers T.....	152
Beli R.....	164	Boido M.M.....	210
Bellenchi G.....	193	Bolino A.....	53
Belli R.....	148	Bolla M.....	141
Beltrami E.....	430	Bolognesi M.....	176
Benedetti V.....	379	Bon C.....	111
Benedicenti F.....	342	Bonaccorso R.....	18
Benfenati F.....	117; 135	Bonacina F.....	228
Benigni A.....	377	Bonaldo P.....	32; 210

Bonato F. ....	176	Cairati N. ....	91
Boni F. ....	288	Calabrese D. ....	65
Bonora E. ....	302	Calabria A. ....	310; 342; 348; 367
Bordoni A. ....	76	Calbi V. ....	310
Borgogno M. ....	141	Calderan C. ....	238
Borrè A. ....	428	Calorio C. ....	156
Borri Voltattorni C. ....	291	Cambria C. ....	106
Borroni B. ....	214	Cancedda L. ....	141; 144
Borroni E. ....	319	Canepari C. ....	315
Borsotti C. ....	319	Cangiano L. ....	288
Bouche V. ....	386	Cantaffa C. ....	322
Bozzetti M.G. ....	146	Cantore A. ....	315
Bozzoni I. ....	13	Capasso P. ....	231
Bresolin N. ....	76; 82	Capitani N. ....	345
Brigida I. ....	359	Capo V. ....	260; 331
Brischigliaro M. ....	59; 236	Cappella M. ....	49
Broccoli V. ....	122; 148; 154; 202	Cappellini M.D. ....	310
Broggi F. ....	6	Cappelluti M.A. ....	231
Broggini L. ....	176	Cappuccio G. ....	412
Brunetti--Pierri N. ....	248; 412	Capra V. ....	412
Bruno C. ....	2; 15; 70; 78	Carbognin E. ....	189
Bruno E. ....	429	Carbone E. ....	156
Brusco A. ....	214	Carbone F. ....	233
Brusco S. ....	122	Cardani R. ....	49
Bruzzone S. ....	15	Cardinali B. ....	23; 49
Bucci C. ....	164	Carecchio M. ....	202
Buchholz K. ....	434	Cariboni A. ....	283
Buquicchio F. ....	331	Carissimo A. ....	334
Bussani E. ....	171	Carninci P. ....	111
<hr/>		Carotti M. ....	25
<b>C</b>		Carrella D. ....	412
Cacace V. ....	195	Carrella S. ....	191; 293
Cacchiarelli D. ....	386	Carriglio N. ....	342
Cagnotto A. ....	205	Carrabba M. ....	354
Caiazzo M. ....	193	Caruso D. ....	214

XX Convention Scientifica 28 - 30 ottobre 2019

Caruso E.....	205	Cescon M. ....	210
Casali C. ....	65	Cherubini E.....	139
Casareto L.....	416	Chiantia G.....	156
Casari G.....	185; 412	Chiapparini L. ....	65
Casarotto E. ....	207; 210	Chierichetti M. ....	207; 210
Cascino F.....	178	Chiesa R.....	173; 205
Cascione S.....	326	Chimenti C.....	226
Casella M. ....	276	Chini B. ....	93
Caserta I.....	231	Choi K. ....	324
Casirati G. ....	329	Ciampi O.....	377
Cassina L. ....	185	Ciampoli M.....	93
Cassioli C.....	345	Ciani E. ....	120
Castagnaro S.....	32	Cicalese M.P.....	310; 359; 367
Castagnetti F.....	13	Cicardi M.E.....	210
Castellani G.....	93	Ciceri F. ....	306; 310; 322; 329; 367
Castello R.....	412	Cieri F. ....	73
Castiello M.C.....	331; 362	Cilia R. ....	416
Castiglioni I. ....	348	Cingolani L.....	109
Catalano F.....	334	Cinque L. ....	263
Cattaneo E. ....	187	Ciotti F.....	241
Cattaneo F. ....	61	Cittaro D.....	348; 351
Cattaneo S. ....	148	Codazzi F. ....	185
Cattenoz P. ....	146	Colamatteo A. ....	233
Catto V.....	276	Colasante G.....	122
Cavestro C.....	202	Coletta I.....	268
Cecatiello V.....	205	Collombat P.....	129
Cecchele A. ....	178	Colombi I.....	141; 144
Cecere F. ....	342	Comerio L.....	205
Cellini B.....	291	Comi Giacomo.....	2; 56
Centrulo M.....	299	Comi Giacomo Pietro .....	76; 82
Cerbai E.....	37	Comitato A. ....	297
Cereda C. ....	91	Concilli M. ....	334
Cernigliaro C. ....	197	Condò I.....	111
Cerqua C. ....	238	Consalez G.....	113
Cesana L.....	243	Conte A. ....	65

Conte I. ....	295
Contestabile A. ....	141; 144
Coppini R. ....	37
Corcelli A. ....	218
Corrà S. ....	59; 236
Corradi A. ....	117; 135
Corsi A. ....	268
Corsini A. ....	276
Corti A. ....	432
Corti S. ....	76; 82
Costa Roberto ....	236
Costa Rodolfo ....	59; 236
Costantini R. ....	253
Costanzi C. ....	214
Cotella D. ....	111
Cotta--Ramusino C. ....	331
Coviello D. ....	416
Cratere M. ....	374
Creamer J.P. ....	324
Cremers F. ....	299
Cremonesi M. ....	228
Crippa S. ....	322
Crippa V. ....	207; 210
Crisafulli L. ....	260
Crispino R. ....	334
Cristofani R. ....	207; 210
Cristofori P. ....	342
Croci L. ....	113
Cucci A. ....	319
Cuccovillo I. ....	348
Cuomo P. ....	248
Curto R. ....	243
Cusano R. ....	260
Cutruzzolà F. ....	291

---

**D**

Da Ros F. ....	32
D"Adda Di Fagagna F. ....	397
Daga A. ....	183
Dal Cortivo G. ....	288
Dalla Serra M. ....	28
Dallabona C. ....	59
Dallavalle S. ....	176
Damiano C. ....	245
D"Amico A. ....	2; 78
D"Angelo C.S. ....	434; 435
D"Angelo E. ....	310
D"Angelo G. ....	20
D"Antonio M. ....	53
Darin S. ....	367
D"Attis S. ....	146
Dazzo E. ....	117
De Amicis R. ....	70; 78
De Angelis A. ....	248
De Cegli R. ....	334
De Franceschi M. ....	120
De Giorgio R. ....	302
De Leonibus C. ....	263
De Leonibus E. ....	191; 193; 195
De Luca A. ....	317
De Luca M. ....	164
De Matteis A. ....	299
De Matteis M.A. ....	400
De Mattia F. ....	342
De Musso M. ....	276
De Pittà C. ....	59; 236
De Risi M. ....	193; 195
De Rosa M. ....	394
De Simone M. ....	253; 342

De Simone S.....	299
De Stefani D.....	169
De Vivo M.....	141
Defilippi P.....	156
Dege C.....	324
Deidda G.....	144
Dejana E.....	403
Del Borrello R.....	231
Del Zotto G.....	15
Delahodde A.....	63
D'Elios M.M.....	345
Dell'Aquila F.....	299
Dellepiane R.....	354
Dello Russo A.....	276
Dell'Orco D.....	288
Desantis G.....	260; 329
Desbats M.....	291
Devuyst O.....	400
Di Bari M.....	205
Di Bernardo D.....	382
Di Campli A.....	214
Di Carlo V.....	13
Di Croce L.....	13
Di Filippo A.....	268
Di Gregorio E.....	214
Di Malta C.....	379
Di Meo I.....	202
Di Micco R.....	313
Di Schiavi E.....	73; 129
Di Tullio G.....	400
Di Zanni E.....	271; 273
Diella E.....	20
Diomede L.....	394
Dionisi M.....	386
Dionisio F.....	367

Ditadi A.....	324; 326
Donati M.A.....	37
Donnini C.....	59; 63
Donsante S.....	268
D'Orsi B.....	169
Draghici E.....	260; 362
Dreesen O.....	397
Drongitis D.....	129
Duchen M.....	35
Duskey J.T.....	205

---

**E**

Eaton S.....	248
Eberini I.....	283
Engel T.....	169
Eriksson M.....	397
Eskelinen E.....	164
Espinoza S.....	111
Esposito A.....	379
Ester G.....	70
Ezhova Y.....	195

---

**F**

Fabio G.....	354
Fabrizi G.M.....	84
Facchinello N.....	63
Fagnocchi L.....	148
Falcone G.....	23; 49
Falconi M.....	322
Fallarino F.....	317
Famà R.....	319
Farinelli G.....	342; 431
Fasciani A.....	148
Fassio A.....	135
Favero M.....	95

Fazzi E. ....	91	Forrester A. ....	263
Fecarotta S. ....	245; 412	Fortunato F. ....	56
Fecchio C. ....	25	Fortunato M. ....	365
Fenu S. ....	65	Fortuni S. ....	111
Ferlazzo G. ....	189	Fraldi A. ....	193; 195
Fernandez--Vizarra E. ....	191	Francesca C. ....	253
Ferrantini C. ....	37	Franco B. ....	191
Ferrari Aggradi C. ....	61	Fresolone L. ....	365
Ferrari G. ....	306; 308; 310	Frezza E. ....	61
Ferrari S. ....	351; 362	Fruscione F. ....	109; 117; 135
Ferrari V. ....	207; 210	Frustaci A. ....	226
Ferraro M.G. ....	193	Fuchs C. ....	120
Ferrero M. ....	214	Fumagalli F. ....	241
Ferretti V. ....	93	Fuschi P. ....	49
Ferriero R. ....	250		
Ferrua F. ....	367	<b>G</b>	
Ficara F. ....	260	Gabaldo M. ....	431; 433
Fiermonte G. ....	88	Gabellini C. ....	148
Filippo C. ....	113	Galasso I. ....	329
Filisetti C. ....	241	Galbiati M. ....	207; 210
Filosa S. ....	129	Galla L. ....	169
Filosto M. ....	65	Gallotta I. ....	73
Fimiani C. ....	111	Galvani G. ....	120
Finetti Federica ....	407	Gambarotto L. ....	32
Finetti Francesca ....	345	Gandolla M. ....	20
Fiumara M. ....	351	Garavaglia B. ....	416
Florio F. ....	9; 11	Garcia--Manteiga J.M. ....	49
Focchi E. ....	106	Gargaro M. ....	317
Follenzi A. ....	319	Gaston--Massuets C. ....	283
Fondazione T. ....	424; 425; 426; 427	Gattillo S. ....	310; 322; 367
Fontana E. ....	260	Gatto F. ....	245
Foppiani A. ....	70; 78	Gavazzo P. ....	98
Forloni G. ....	173	Gavello D. ....	156
Fornelli C. ....	407	Gazzerro E. ....	15
Forni C. ....	431	Gecz J. ....	129

Geginat J. ....	354	Gozzi A. ....	221
Gellera C. ....	65	Gradogna A. ....	271
Gennaccaro L. ....	120	Gragnaniello V. ....	245
Genovese P. ....	331; 351; 362	Grande C. ....	226
Gentile L. ....	84	Grandinetti B. ....	37
Gentner B. ....	241; 260; 329; 342; 348; 367	Grandis M. ....	84
Gesualdo C. ....	299	Grasselli G. ....	135
Gharat V. ....	9	Grassi S. ....	197
Ghezzi Daniele ....	59	Graziadei G. ....	310
Ghezzi Diego ....	144	Graziani A. ....	370
Giamundo G. ....	295	Graziano A. ....	432
Giangrande A. ....	146	Greco G. ....	61
Giannelli Serena. ....	154	Gregori S. ....	154; 243; 365
Giannelli Stefania. ....	367	Greotti E. ....	169
Giannini F. ....	65	Griguoli M. ....	139
Giaquinto E. ....	78	Grimaldi A. ....	386
Giaquinto L. ....	299	Gritti A. ....	91; 178; 181
Giardina G. ....	291	Gritti L. ....	124
Gibson W.T. ....	159	Groen E. ....	28
Giglio F. ....	310	Grohovaz F. ....	185
Giliani S. ....	91	Grottelli S.G. ....	291
Gillingwater T. ....	28	Grumati P. ....	101
Ginevrino M. ....	113	Guadagnino I. ....	293
Giona F. ....	152	Guareschi S. ....	436
Giordano A.M.S. ....	91	Guarneri P. ....	197
Giorgi F. ....	88	Gulino A. ....	308
Giorgino T. ....	394	Gullo F. ....	185
Giorgio E. ....	214	Gustincich S. ....	111; 129
Giuliano T. ....	195		
Giussani P.C. ....	197	<b>H</b>	
Giustetto M. ....	120	Haeberle J. ....	248
Gobbi M. ....	205	Hentschel J. ....	88
Goffrini P. ....	59	Hernandez J.R. ....	253
Goitre L. ....	407	Hernandez R.J. ....	359
Golini E. ....	23	Hidisoglu E. ....	156



Hoxha E.....	214
Hoyng C. ....	299

---

**I**

Ilaria Visigalli I.....	342
Indrieri A.....	191
Indrigo M. ....	122; 148; 154
Inga A.....	28
Intartaglia D.....	295
Iodice C.....	299
Iorio A.....	317
Iuliano A.....	299
Izzi F.....	61

---

**J**

Jacob A.....	351
Jaudon F.....	109
Javier Quintana F.....	317
Jofra Hernández R.....	342
Jones C.....	152
Julkowska D.....	434; 435

---

**K**

Kajaste--Rudnitski A.....	91; 348
Kallikourdis M.....	228
Karali M.....	293
Kheir E.....	11
Kilstrup--Nielsen C.....	120
Klarner F.....	195
Koenig E.....	276
Krzak M.....	356

---

**L**

La Marca G.....	241
La Rocca F.....	73

La Sala G.....	141
Labella R.....	268
Lagostena L.....	273
Lamantea E.....	59
Lamers D.....	126; 150
Lamperti C.....	59
Langione M.....	37
Lasorsa F.M.....	88
Lauria F.....	28
Lauritano A.....	132
Lazarevic D.....	351; 374
Lazzari L.....	322
Leanza L.....	236
Leeb M.....	189
Legati A.....	59
Leone A.....	70; 78
Lettieri A.....	283
Leuzzi V.....	412
Levi M.....	432
Levi S.....	202
Lia F.....	68
Libergoli M.....	9; 11
Lidonnici M.R.....	306; 308; 310
Liguori C.....	61
Lisi M.....	13
Liu T.....	315
Lobasso S.....	218
Lodi T.....	59; 63
Lodovichi C.....	150
Loi M.....	120
Lombardo A.....	91; 231; 351
Longaretti L.....	377
Longatelli V.....	20
Longatti A.....	161
Longo M.....	23

Longobardi E. ....	132
Lopalco P. ....	218
López Tobón A. ....	159
Lougaris V. ....	345
Lucca U. ....	173
Lucchetti J. ....	205
Lucchiari S. ....	56
Luciani M. ....	91; 178
Luff S. ....	324
Luffarelli R. ....	111
Lunetta C. ....	65
Luoni M. ....	154
Lupi F. ....	37
Lupo M. ....	299
Lusito E. ....	322

---

**M**

Maderna C. ....	403
Maffia V. ....	195
Maffioletti S. ....	324
Magliano L. ....	84
Maglione V. ....	189
Maitz S. ....	412
Makris G. ....	248
Malabarba L. ....	322
Malacarne V. ....	370
Malinverno M. ....	403
Mallamaci A. ....	111
Mammano F. ....	391
Manco R. ....	356
Mancuso M. ....	39
Mandillo S. ....	23
Manes M. ....	214
Manfredi A. ....	386
Manganelli F. ....	164

Mangiameli E. ....	178
Maniscalco F. ....	28
Manni G. ....	317
Manno M. ....	176
Mantegazza M. ....	124
Mantero S. ....	260
Manzi M. ....	351
Maragliano L. ....	135
Marcantoni A. ....	156
Marchi S. ....	407
Marchioretto M. ....	28
Marcovecchio G. ....	331
Margulies C. ....	331
Marigo V. ....	297
Marino V. ....	288
Mariotti C. ....	65
Marktel S. ....	306; 308; 310
Marrocco E. ....	193; 299
Martella D. ....	37
Martelli F. ....	23; 49
Martello G. ....	189
Martini D. ....	148
Martini E. ....	228
Martino S. ....	178
Martone J. ....	13
Martorano L. ....	59
Masera N. ....	310
Maset A. ....	150
Masone A. ....	205
Massa F. ....	185
Massa R. ....	61
Massarotti A. ....	370
Massimiliano C. ....	28
Massimino L. ....	148; 154
Masson R. ....	70; 78

XX Convention Scientifica 28 - 30 ottobre 2019

Mastella C. ....	70; 78	Merlin S. ....	319
Mastrangelo E. ....	394	Merlini G. ....	84
Mastrototaro G. ....	148	Meroni M. ....	210
Matafora V. ....	348	Messi E. ....	210
Matarazzo M.R. ....	356	Messina C. ....	322
Matarese G. ....	233	Metti S. ....	32
Matarese M. ....	379	Miano M.G. ....	129
Matino D. ....	317	Micalizzi A. ....	113
Mattarei A. ....	183	Miceli F. ....	132
Mattia Z. ....	148	Michetti C. ....	135
Mattioli M. ....	181	Micillo T. ....	233
Mauri L. ....	197	Migliara A. ....	91; 231
Maurizi A. ....	257	Migliavacca M. ....	342; 367
Mauro A. ....	84	Miglietta S. ....	241
Mauro C. ....	370	Milani Mario. ....	288; 394
Mauro L. ....	61	Milani Michela ....	315
Mauro V. ....	253; 342	Milani R. ....	310; 322
Mazzantini C. ....	37	Milano G. ....	276
Mazzeo A. ....	84	Minervini G. ....	68
Mazzoleni S. ....	126	Minetti C. ....	15
Medici G. ....	120	Mingozzi F. ....	56; 141
Medina Sanabria D.L. ....	400	Minopoli N. ....	245
Medina D.L. ....	103	Minopoli R. ....	299
Melis D. ....	233	Mirra N. ....	310
Melzi V. ....	82	Missero C. ....	388
Meneghini S. ....	185	Mitro N. ....	214
Menegollo M. ....	35	Modi B. ....	139
Menetti V. ....	338	Moggio M. ....	56
Meola G. ....	49	Molteni F. ....	20
Meraviglia V. ....	276	Monaco A. ....	195
Mercolini L. ....	88	Monaco L. ....	428; 433; 434
Mercuri E. ....	331; 351	Montaldo E. ....	322
Merelli I. ....	260; 308; 329; 351; 367	Montano V. ....	39
Merico A. ....	430	Montesano M. ....	65
Merla G. ....	416	Monti B. ....	88

Monti I.....	367
Monti M.....	250
Montini E.....	310; 329; 342; 348
Montioli R.....	291
Mora G.....	65
Mora M.....	416
Morena F.....	178
Moro E.....	189
Morone B.....	356
Morra V.....	400
Morris S.....	324
Mortellaro A.....	342; 359
Mosca I.....	132
Motta A.....	248
Munari L.M.....	436
Muntoni F.....	35
Murru L.....	106; 126; 161
Musacchia F.....	412
Musarò A.....	42
Musco G.....	205
Mutarelli M.....	412
Muzi Falconi M.....	338

---

**N**

Naldini L.....	91; 241; 243; 310; 315; 322; 331; 342; 348; 351; 359; 362; 421
Naldini M.M.....	329; 367
Napolitano G.....	379
Nappi P.....	132
Narducci R.....	141
Nasca A.....	59
Navas P.....	238
Nigro V.....	412
Nizzardo M.....	76; 82
Nobile C.....	117

Nobili L.....	61
Nolano M.....	164
Nonno R.....	205
Norata G.D.....	228
Norata R.....	342
Notarangelo L.D.....	362
Nuovo S.....	113
Nusco E.....	195; 400
Nussbaum R.....	400

---

**O**

Obici L.....	84
Ognio E.....	15
Oleari R.....	283
Olgasi C.....	319
Oliviero S.....	319
Omrani M.....	367
Onnis A.....	345
Orcesi S.....	91
Orford M.....	248
Origa R.....	310
Ornaghi F.....	178
Orsi A.....	266
Ortega Martínez J.A.....	141
Ostuni R.....	322; 367

---

**P**

Padula A.....	250
Pagani F.....	171
Pagliarani S.....	56
Pagliari E.....	76
Paiardini A.P.....	291
Palagano E.....	260
Palandri C.....	37
Palmisano B.....	268

Panariello F. ....	386	Perfetti A. ....	23; 49
Pandey U. ....	68	Perna F. ....	233
Paniccia A. ....	421	Perocheau D. ....	248
Panicucci C. ....	15	Perrelli A. ....	407
Papa F. ....	9	Perrotta S. ....	310
Papaleo F. ....	93	Persichetti A. ....	268
Papasergi S. ....	197	Persichetti F. ....	111
Parenti G. ....	233; 245	Peruzzo R. ....	236
Pareyson D. ....	65; 84	Pessina F. ....	397
Parini R. ....	241	Peters R. ....	315
Paris P. ....	248	Petralla S. ....	88
Parmeggiani C. ....	37	Petrillo C. ....	348
Parrini M. ....	141; 144	Petrini E. ....	139
Pasqualato S. ....	205	Petruzzelli R. ....	334
Pasqualetto E. ....	374	Picco C. ....	271
Passafaro M. ....	106; 126; 161	Piccolella M. ....	210
Passarella D. ....	176	Piccoli G. ....	200
Passeri L. ....	365	Piccolo P. ....	250
Passerini L. ....	365	Piccolo A. ....	273
Passoni A. ....	187	Pierattini B. ....	111
Patanella L. ....	185	Pierrel F. ....	238
Patarroyo--White S. ....	315	Pietrobon D. ....	95
Pavinato L. ....	214	Pimpinella D. ....	139
Pazienti A. ....	139	Pinelli M. ....	412
Pearce D. ....	434	Pinton P. ....	88; 407
Pedemonte M. ....	70; 78	Piol D. ....	68
Pederzoli F. ....	187	Pioner J.M. ....	37
Pedrocchi A. ....	20	Piras F. ....	348
Pegoraro E. ....	35; 416	Pirola A. ....	61
Pendin D. ....	183	Pisano I. ....	88
Penna S. ....	260	Pizzamiglio L. ....	106
Pennisi E.M. ....	42	Pizzo M. ....	293
Pennuto M. ....	68; 207; 210	Pizzo P. ....	169
Perenthaler E. ....	28	Pizzorusso T. ....	120
Peretto L. ....	171	Placidi F. ....	61

Plebani A.....	345
Poeta E.....	88
Poeta L.....	129
Poggesi C. ....	37
Poletti A.....	207; 210
Polishchuk E.....	299; 334
Polishchuk R. ....	299; 334
Politano L.....	416
Pompilio G. ....	276
Pontesilli S. ....	241
Ponzoni L. ....	124; 152; 161
Ponzoni M.....	308
Pooni--Krishnan V.....	356
Porcelli V.....	88
Porrello E. ....	18
Portioli C. ....	141
Pozzi E.....	214
Pozzi S.....	436
Previtali Stefano C.....	53
Previtali Stefano Carlo.....	18; 164
Principi E. ....	15
Prinetti A.....	197
Prioni S.....	197
Proserpio P. ....	61
Protasi F.....	45
Provenzano C.....	23; 49
Pucci C. ....	148
Pulcrano S.....	193
Puricella A.....	146
Pusch M. ....	98

---

**Q**

Quaranta P.....	367
Quattrone A.....	28
Querceto S.....	37

Querin G.....	65
---------------	----

---

**R**

Raffaghello L. ....	15
Ramirez A.....	76
Rampoldi L. ....	374
Ranghetti A. ....	351
Rapezzi C. ....	84
Rasmusson R.L. ....	156
Ratto G.M.....	126; 150
Ravasi M.....	436
Ravella S.....	70; 78
Redaelli D. ....	241
Redaelli V. ....	173
Remoli C.....	268
Ren E. ....	120
Renieri A.....	416
Requena J.....	205
Reschigna A.....	231
Restelli E.....	205
Riba M.....	374
Ricagno S.....	176
Ricca A.....	178
Riccardi F.....	171
Riccardo S.....	386
Ricci G. ....	39
Riccio A.....	280
Rigoni R. ....	326
Riminucci M. ....	268
Ripamonti M. ....	202
Ripolone M.....	56
Risato G.....	25
Riva M. ....	181
Riva N. ....	65
Rivellini C.....	164

Rizzi E.....	429
Rizzo F.....	82
Rizzuti M.....	76
Rizzuto R.....	169
Robey P.....	268
Roiter I.....	173
Romani M.....	113
Romano A.....	191
Romano G.....	171
Romano R.....	164
Romei A.....	117; 135
Romigi A.....	61
Ronzitti G.....	56; 141
Rosa A.....	13
Rosano C.....	233
Rossi A.....	233
Rossi C.....	306; 310
Rossi S.....	299
Rossiello F.....	397
Rossini A.....	276
Rossini M.....	20
Rovelli A.....	241
Rubinacci A.....	308
Rubino A.....	61
Rubio A.....	202
Rucci N.....	257
Ruffo E.....	370
Ruiz Ceja K.A.....	293
Ruozzi B.....	187
Rusmini P.....	207; 210
Russo C.....	388
Russo F.....	243
Russo M.....	84
Russo Roberta.....	111
Russo Rosaria.....	176

---

**S**

Sabatelli M.....	65; 84
Sabatelli P.....	32
Sacchetti N.....	362
Sacchetto R.....	25
Sacconi L.....	37
Saggio I.....	268
Sala C.....	124
Sala D.....	178
Sala L.....	243
Sala M.....	124; 152; 161
Saladino P.....	197
Salani S.....	82
Salerio F.A.....	367
Salierno F.G.....	295
Salio C.....	156
Sallese M.....	214
Salmona M.....	187; 205
Salvatore A.M.....	391
Salviati Leonardo.....	238
Salviati Leonardo Salviati.....	291
Sambri I.....	185; 195
Sanavio B.....	430
Sandona" D.....	25
Sangiorgi L.....	416
Sansone V.....	61
Santambrogio P.S.....	202
Santini L.....	37
Santoleri L.....	310; 322
Santoni De Sio F.....	365
Santonicola P.....	73
Santorelli F.....	185
Santoro C.....	111
Santoro L.....	84; 164

XX Convention Scientifica 28 - 30 ottobre 2019

Santoro M.....	400	Simonelli F.....	299
Santulli C.....	111	Sitia R. ....	266
Sanvito F.....	342	Soardi M.....	25
Sartiani L.....	37	Sobacchi C.....	260
Sartirana C.....	359	Sol S.....	388
Sarzana M.....	241	Soldovieri M.V.....	132
Sassoè--Pognetto M. ....	156	Sommariva E. ....	276
Savardi A.....	141	Soraru" G. ....	65
Saverio Francesco R.....	407	Soria L. ....	248
Scala M.....	412	Sorrentino C.....	193; 195
Scala S.....	260; 322; 342; 359; 367	Sorrentino I.....	266
Scalisi G.....	317	Sorrentino V.....	45
Scalmani P. ....	124	Spanetta M. ....	61
Scano M.....	25	Spaziano A.....	191
Scanziani E.....	260	Specchia V.....	146
Scaramuzza S.....	306; 310	Spica E.....	268
Scarfò R.....	324	Squadrito M.....	326
Schaeffer C.....	374	Squeri G.....	243
Schinke T.....	260	Stadiotti I.....	276
Schirotti G.....	331	Staiano L.....	400
Scholz--Starke J.....	271	Sterlini B.....	117; 135
Schrader T.....	195	Sthandier O. ....	13
Sciacco M.....	416	Storto M.....	308
Scolari F.....	374	Strazzullo M.....	356
Scopece A.....	276	Strimpakos G.....	23
Scorrano L.....	286	Strisciuglio P.....	233
Scotto Rosato A.....	103	Strollo S.....	245
Selicorni A.....	412	Stroppiano M.....	416
Selig S.....	356	Sturgeon C.M.....	324
Sergi Sergi L.....	260; 359	Suman M.....	35
Sessa A.....	148	Surace Enrico .....	299
Settembre C.....	263	Surace Enrico Maria .....	191
Sgaravizzi G.....	291	Szabadkai G.....	35
Siciliano G.....	39	Szabo I.....	236
Silani V.....	65		



---

**T**

Tagliatela M. ....	132
Tagliavini F. ....	173
Taiana M. ....	76; 82
Tammaro C. ....	374
Tapella L. ....	205
Tarallo A. ....	245
Tartaglione I. ....	310
Tartagni O. ....	88
Tassara M. ....	322
Tassinari M. ....	120
Taveggia C. ....	53
Taverna S. ....	148; 202
Tavian D. ....	42
Tebaldi T. ....	28
Tedesco B. ....	207; 210
Telethon F. ....	423
Tempia F. ....	214
Tempio T. ....	266
Tesi C. ....	37
Testa G. ....	159
Testi R. ....	111
Teti A.M. ....	257
Tettamanti M. ....	173
Thalhammer A. ....	109
Tiberi P. ....	299
Tiboni F. ....	306
Tigem S. ....	420
Tinnirello R. ....	197
Tiradani L. ....	178
Tiranti V. ....	202
Tiso N. ....	59; 63
Tomasoni S. ....	377
Tondo C. ....	276

Tonlorenzi R. ....	18; 164
Torella A.L. ....	412
Tornabene P. ....	299
Torrente Y. ....	11
Tosatto L. ....	68
Tosatto S. ....	68
Tosi G. ....	187; 205
Tottene A. ....	95
Toubiana S.T. ....	356
Tozzi A. ....	152
Trabalzini L. ....	407
Trapani I. ....	299
Trattaro S. ....	159
Trazzi S. ....	120
Tresoldi C. ....	322
Trevisson E. ....	238
Trionfini P. ....	377
Tripathy D. ....	214
Tripodo C. ....	308; 397
Tron G. ....	370
Trudu M. ....	374
Tucci F. ....	241
Tuccillo M. ....	129
Tufano M. ....	193
Tullio P. ....	169
Tupler R. ....	2
Turco E. ....	156
Turnu L. ....	276

---

**U**

Unali G. ....	348
Urciuoli G. ....	388
Uva P. ....	260

---

**V**

Vaccaro L. ....	386
Vai S. ....	6
Valassina N. ....	122
Valente E.M. ....	113
Valente P. ....	135
Valentino M.E. ....	403
Valenza M. ....	187
Vanni I. ....	205
Varani S. ....	430
Vasco C. ....	354
Vavassori V. ....	331; 351; 362
Vedovelli L. ....	183
Velnati S. ....	370
Verardo R. ....	226
Vercelli A. ....	210
Verpelli C. ....	124; 152
Verrillo L. ....	129
Vezzoli M. ....	253; 342
Viarengo G. ....	310
Vicidomini A. ....	171
Vicinanza M. ....	400
Vidal P. ....	56
Viero G. ....	28
Vilardo C. ....	379
Villa A. ....	260; 326; 331; 362
Villa I. ....	308
Vinci E. ....	152
Virgili M. ....	88
Visentin C. ....	176
Visigalli I. ....	253
Vita G. ....	84
Vitelli E. ....	65
Vitiello G. ....	412

Vitriolo A. ....	159
Voellenkle C. ....	23; 49
Volani C. ....	276
Volpin M. ....	329

---

**W**

Waddington S. ....	248
Walker G. ....	319
Wang C.M. ....	433; 434
Weksberg R. ....	159

---

**X**

Xue E. ....	322
-------------	-----

---

**Y**

Yoboue E. ....	266
----------------	-----

---

**Z**

Zampelli A. ....	379
Zampi G. ....	73
Zancan S. ....	432
Zanello G. ....	434
Zanni G. ....	113
Zanzoni S. ....	291
Zara F. ....	109; 117
Zatti A. ....	429
Zeviani M. ....	191; 236
Ziogas I. ....	141
Zoccolillo M. ....	359
Zonari E. ....	241; 260; 329
Zuccaro E. ....	68
Zucchelli C. ....	205
Zucchelli S. ....	111; 129

