

Genetic muscular disease\Muscular dystrophies

1. P2X7 RECEPTOR ANTAGONIST REDUCES FIBROSIS AND INFLAMMATION IN A MOUSE MODEL OF ALPHA-SARCOGLYCAN MUSCULAR DYSTROPHY

Principi E.^[1], Raffaghello L.^[1], Bruno C.^[1], Baratto S.^[1], Pintus S.^[1], Panicucci C.^[1], Bruzzone S.^[2], Benzi A.^[2], Gazzero E.^[3], Scudieri P.^[1], Antonini F.^[1], Del Zotto J.^[1]

^[1]IRCCS Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[2]dipartimento di medicina sperimentale DIMES ~ Genova ~ Italy,

^[3]Unit of Muscle Research, Experimental and Clinical Research Center Charité Universitätsmedizin ~ Berlin ~ Germany

Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD)R3, a rare autosomal recessive myopathy characterized by progressive involvement of the pelvic and shoulder girdles, is caused by mutations in the alpha-sarcoglycan gene (SGCA). SGCA encodes a transmembrane protein, α -sarcoglycan (α -SG), which, together with other 3 SG members (β , γ and δ), interacts with dystrophin, forming the dystrophin-glycoprotein complex (DGC).

The DGC disruption leads to a more fragile muscle plasma membrane which is easily damaged during contraction allowing the release of Damage-Associated Molecular Pattern Molecules, such as ATP. Extracellular ATP activates P2X7 receptor and exacerbates myofiber injury by increasing sarcolemma permeability and by inducing local inflammation. Thus, P2X7 is an attractive therapeutic target for muscular dystrophies including LGMDR3 for which no treatments are available.

Aim of this study was to evaluate the therapeutic effectiveness of a selective P2X7 receptor antagonist, A438079, in a mouse model of LGMDR3.

Sgca null mice were treated with A438079 every two days at 3 mg/Kg for 24 weeks. The P2X7 antagonist improved clinical parameters by ameliorating muscle performance and decreasing serum creatine kinase levels. Histological analysis of muscle morphology indicated a significant reduction of the percentage of central nuclei, of fiber size variability and of the extent of local fibrosis and inflammation. Specifically, A438079 significantly decreased the percentage of innate immune cells and up-regulated immunosuppressive regulatory T cells.

This study demonstrates that P2X7 targeting by the selective antagonist A43879 counteracts the progression of the dystrophic phenotype of Sgca null mice by dampening the extent of muscle fibrosis and local inflammation. Therefore, P2X7 antagonism via selective inhibitors could be included in the immunosuppressant strategies aimed to reduce the basal immune-mediated damage and to favor a better engraftment of gene-cell therapies.

L'antagonista del recettore P2X7 riduce la fibrosi e l'infiammazione in un modello murino di alfa-sarcoglicanopatia

La distrofia muscolare dei cingoli (LGMD) R3, è una rara miopatia autosomica recessiva caratterizzata dal coinvolgimento progressivo dei cingoli pelvici e della spalla ed è causata da mutazioni nel gene alfa-sarcoglicano (SGCA). SGCA codifica per una proteina transmembrana, α -sarcoglicano (α -SG), che, insieme ad altri 3 membri SG (β , γ e δ), interagisce con la distrofina, formando il complesso distrofina-glicoproteina (DGC).

L'interruzione del DGC porta a una membrana plasmatica muscolare più fragile che viene facilmente danneggiata durante la contrazione consentendo il rilascio di molecole che inducono danno cellulare e tissutale come ad esempio l'ATP. L'ATP extracellulare attiva il recettore P2X7 e aggrava il danno miofibrile aumentando la permeabilità del sarcolemma e inducendo l'infiammazione locale. Pertanto, P2X7 è un bersaglio terapeutico interessante per le distrofie muscolari, inclusa la LGMDR3, per le quali ad oggi non sono disponibili trattamenti.

Lo scopo di questo studio è stato valutare l'efficacia terapeutica di un antagonista selettivo del recettore P2X7, A438079, in un modello murino di LGMDR3.

I topi privi di Sgca sono stati trattati con A438079 ogni due giorni alla dose di 3 mg/Kg per 24

settimane. L'antagonista P2X7 ha migliorato i parametri clinici migliorando le prestazioni muscolari e diminuendo i livelli sierici di creatina chinasi. L'analisi istologica della morfologia muscolare ha indicato una significativa riduzione della percentuale di nuclei centralizzati, della variabilità delle dimensioni delle fibre e dell'estensione della fibrosi e dell'infiammazione a livello muscolare. In particolare, A438079 ha ridotto significativamente la percentuale di cellule immunitarie che svolgono un'importante funzione nel modulare la risposta infiammatoria.

Questo studio dimostra che il blocco di P2X7 da parte dell'antagonista selettivo A43879 contrasta la progressione del fenotipo distrofico dei topi privi di Sgca riducendo l'estensione della fibrosi muscolare e dell'infiammazione locale. Pertanto, il blocco del P2X7 tramite inibitori selettivi potrebbe essere incluso nelle strategie immunosoppressive volte a ridurre il danno immuno-mediato basale e a favorire un migliore attecchimento delle terapie genico-cellulari.

Disease Name:

Alpha-sarcoglycanopathy

Nome malattia:

Alfa-sarcoglicanopatia

Project number:

GGP17192

2. 3D MODELLING OF RARE MUSCULAR DISEASES, A POWERFUL PLATFORM FOR BASIC STUDIES AND DRUG VALIDATION

Benetollo A.^[4], Maghin E.^[2], Carraro E.^[2], Fuoco C.^[1], Caccin P.^[4], Scano M.^[4], Carotti M.^[4], Canton M.^[4], Sachetto R.^[3], Gargioli C.^[1], Piccoli M.^[2], Sandonà D.^[4]

^[1]Università di Roma Tor Vergata, Department of Biology ~ Roma ~ Italy, ^[2]Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza (IRP) ~ Padova ~ Italy, ^[3]University of Padova, Department of Comparative Biomedicine and Food Science, Agripolis ~ Legnaro, Padova ~ Italy, ^[4]Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Via U. Bassi 58/B ~ Padova ~ Italy

Major aim of this project is the modeling of 3D muscle structures mimicking two severe muscular dystrophies (MDs): sarcoglycanopathy (LGMDR3-6) and Duchenne muscular dystrophy (DMD) [1]. The generation of such artificial pathological muscles arises from the need of valuable and versatile tools for testing the efficacy of potential drugs, overcoming the lack of underperforming animal models [2, 3], by one side, and posing the bases for future experiments of personalized medicine, on the other side.

Nowadays, skeletal muscle tissue engineering represents an emerging and promising field for the production of artificial 3D constructs, which are far superior to 2D cultures in terms of replying complex cellular processes and mirroring muscle architecture and physiological responses. Thus, we propose two well-consolidated strategies for the generation of artificial 3D muscles using immortalized myogenic cells from sarcoglycanopathy and DMD subjects.

The first strategy relies on the engraftment of immortalized myogenic cells (from both healthy and dystrophic subjects) on a decellularized extracellular matrix (mouse diaphragm) [4, 5]. While an in-depth characterization of the mouse diaphragm scaffold is still ongoing, we successfully accomplished the re-cellularization with healthy and DMD cells. Conversely, when LGMDR3 myoblasts were used, we observed that cells remained on the surface of the scaffold and scarcely penetrated the matrix. Presently, we are investigating the reason of such different behaviour.

The second approach exploits the formulation of a customized bio-ink combining the myogenic cells with biomimetic matrix for biofabricating a 3D artificial muscle model [6, 7]. Through this procedure, we obtained constructs that kept in vitro undergone remodelling and maturation. To

improve this process, constructs were maintained under constant tension. After 10/15 days we observed the spontaneous contraction of the muscle engineered tissues (METs). In the supernatant of METs we were able to measure the content of the muscular enzyme creatine phospho kinase (CPK). Of note, the amount of CPK released from LGMDR3 METs maintained under basal conditions was almost double that measured in the supernatant of healthy METs. This was expected considering the genotype of the myoblasts used (MD vs healthy), and strongly suggests that the 3D artificial muscle models faithfully recapitulated the disease phenotypes. Experiments are now planned to set up different conditions of stimulation such as mechanical, electrical or chemical, resembling physio-pathologic occurrences.

The reversion of the mutation in LGMDR3 myogenic cells through CRISPR/Cas9 genome editing is undergoing and will allow for final validation of the results in cells sharing identical genetic background.

We are confident that the platform under construction, useful for the validation of new compounds, will be versatile and performant, shortening the drug development process in MDs.

MUSCOLI MODELLO 3D DI RARE DISTROFIE MUSCOLARI, UNA POTENTE PIATTAFORMA PER STUDI DI BASE E VALIDAZIONE DI FARMACI

Questo progetto mira a creare strutture muscolari 3D che mimano due gravi forme di distrofia muscolare (DM): le sarcoglicanopatie (LGMDR3-6) e la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) [1]. Questo scopo nasce dall'esigenza di disporre di strumenti validi e versatili per testare farmaci, superando la mancanza di modelli animali idonei [2, 3] e pone le basi per esperimenti di medicina personalizzata.

Ad oggi, l'ingegneria tissutale del muscolo scheletrico è un campo emergente e promettente per la creazione di costrutti artificiali in 3D di gran lunga superiori alle colture 2D sia nella somiglianza dell'architettura muscolare che nelle risposte fisiopatologiche. Proponiamo quindi due strategie ben consolidate per la generazione di muscoli 3D artificiali con cellule miogeniche immortalizzate, provenienti da soggetti con LGMDR3 e DMD.

La prima strategia si basa sul trapianto delle cellule (di soggetti sani e distrofici) su una matrice extracellulare decellularizzata (diaframma di topo) [4, 5] che stiamo accuratamente caratterizzando. Nel frattempo abbiamo portato a termine con successo la ricellularizzazione degli scaffold con cellule sane e DMD. Invece negli esperimenti di ricellularizzazione con cellule LGMDR3 abbiamo osservato come le cellule rimanevano sulla superficie dello scaffold e possedevano una bassa capacità di penetrazione nella matrice. Attualmente, stiamo indagando il motivo di tale comportamento.

Il secondo approccio sfrutta la formulazione di un bioinchiostro che combina cellule miogeniche con una matrice biomimetica e viene usato per la biostampa di un modello muscolare 3D artificiale (MET) [6, 7]. Attraverso questa procedura abbiamo ottenuto dei costrutti che mantenuti in vitro hanno rimodellato e maturato. Per migliorare il processo, i MET sono stati sottoposti a costante tensione. Dopo 10/15 giorni i muscoli artificiali hanno iniziato a contrarsi spontaneamente. Nel supernatante dei costrutti abbiamo quindi misurato il contenuto dell'enzima muscolare creatinfosfochinasi (CPK). La quantità di CPK rilasciata dai MET LGMDR3 mantenuti in condizioni basali era quasi doppia rispetto a quella dei campioni sani. Questo, previsto considerando il genotipo dei mioblasti utilizzati (DM vs sani), suggerisce con forza che i modelli muscolari 3D ricapitolino fedelmente i fenotipi patologici. Abbiamo programmato esperimenti per testare diverse condizioni di stimolazione (meccaniche, elettriche o chimiche) simili ad eventi fisiopatologici.

È in corso la reversione della mutazione nelle cellule malate (LGMDR3) utilizzando l'editing genomico CRISPR/Cas9 che consentirà la convalida finale dei risultati in cellule che condividono lo stesso background genetico.

Siamo fiduciosi che questa piattaforma, utile per la validazione di nuovi composti, sarà versatile e promettente, riducendo il processo di sviluppo dei farmaci nelle DM.

Disease Name:

Alpha-sarcoglycanopathy; Duchenne Muscular Dystrophy

Nome malattia:

Alfa-sarcoglicanopatia; Distrofia Muscolare di Duchenne

Project number:

GGP20097

3. NATURAL HISTORY OF BECKER MUSCULAR DYSTROPHY: TOWARD TRIAL READINESS

Gorgoglione D.*^[1], Sabbatini D.^[1], D'Amico A.^[2], Bruno C.^[6], Moroni I.^[3], Previtali S.^[4], Mercuri E.M.^[5], D'angelo M.G.^[7], Battini R.^[8], Vincenzo Nigro V.^[9], Sansone V.^[10], Berardinelli A.L.^[11], Messina S.^[12], Magri F.^[13], Ferlini A.^[14], Pini A.^[15], Mongini T.^[16], Servidei S.^[17], Bello L.^[1], Pegoraro E.^[1]

^[1]Dipartimento di Neuroscienze, Università di Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]Unità di Medicina Molecolare per le Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù-IRCCS ~ Roma ~ Italy, ^[3]Unità di Neurologia dello Sviluppo, Fondazione Istituto Neurologico "Carlo Besta"-IRCCS ~ Milano ~ Italy, ^[4]Istituto di Neurologia Sperimentale- Divisione di Neuroscienze- Ospedale S. Raffaele ~ Milano ~ Italy, ^[5]Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli ~ Roma ~ Italy, ^[6]Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione – Istituto Giannina Gaslini-IRCCS ~ Genova ~ Italy, ^[7]Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea- IRCCS, Bosisio Parini, Milano ~ Milano ~ Italy, ^[8]Dipartimento di Neuroscienze dello Sviluppo, IRCCS Fondazione Stella Maris ~ Pisa ~ Italy, ^[9]Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli ~ Napoli ~ Italy, ^[10]Centro Clinico Nemo-Fondazione Serena Onlus Ospedale Niguarda ~ Milano ~ Italy, ^[11]Neuropsichiatria Infantile, IRCCS Istituto "C. Mondino", Università di Pavia ~ Pavia ~ Italy, ^[12]Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche e Anestesiologiche, Università di Messina ~ Messina ~ Italy, ^[13]Fondazione IRCCS Cà Grande – Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milano ~ Italy, ^[14]Università di Ferrara ~ Ferrara ~ Italy, ^[15]Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna – IRCCS ~ Bologna ~ Italy, ^[16]Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, Centro per le Malattie Neuromuscolari P. Peirolo, Dipartimento di Neuroscienze ~ Torino ~ Italy, ^[17]Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS ~ Roma ~ Italy

Background: Becker Muscular Dystrophy (BMD) is a rare progressive neuromuscular disease caused by mutations in the DMD gene, encoding the dystrophin protein. There is no definitive cure for BMD: the high clinical variability, the slow progression and rarity of the disease represent serious barriers to drug development. To overcome the rarity of the disease an Italian Multicentre BMD study group has been established under the aegis of Telethon. The overarching goals of the project include the collection of retrospective and longitudinal BMD data and DNA samples to describe the natural history of the disease in order to identify outcome measures to be used in future clinical trials. Moreover, leveraging on the collected clinical data in the first two years of the project will allow to perform a Whole Genome Association Study (GWAS) for the identification and characterization of genetic modifiers in BMD.

Methods: Retrospective clinical and genetic data were collected from 17 Italian neuromuscular centres to build a multicentre dataset for a total of 856 patients. Patients were grouped by age and by reading frame retention of the DMD gene. The subset of patients carrying in-frame exonic deletion or duplication of the DMD gene was further classified based on the specific mutation. Statistical analyses were conducted to compare age at Loss of Ambulation (LoA) and parameters of cardiac and respiratory muscle function in all mutational subgroups.

Results: Analysis of LoA showed that the mean age at LoA was 35.10 years (CI of 31.58-38.62) with median survival age at LoA of 69 years and confirmed that out-of-frame mutations (9%) are associated with an earlier LoA (p<0.001). In addition, by comparing the various subgroups we

observed that deletion 45-49 were associated to earlier LoA ($p<0.001$) and N-terminal ($p<0.05$) and 45-48 ($p<0.01$) deletions to decreased left ventricular systolic function.

Conclusions: These preliminary results contribute to better define the natural history of BMD. The continuously expanded dataset and this large cohort of BMD patients harbour a great potential for the preparation of future robust clinical trials.

STORIA NATURALE DELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI BECKER: IN PREPARAZIONE DI FUTURI STUDI CLINICI

La distrofia muscolare di Becker (Becker Muscular Dystrophy, BMD) è una rara malattia neuromuscolare progressiva causata da mutazioni nel gene DMD, che codifica per la proteina distrofina. Ad oggi non esiste una cura definitiva per la BMD: l'elevata variabilità clinica, la lenta progressione e la rarità della malattia rappresentano dei seri ostacoli allo sviluppo di farmaci. Per fare fronte alla rarità della malattia è stato istituito, sotto l'egida di Telethon, un gruppo multicentrico italiano di studio della BMD. Gli obiettivi del progetto includono la raccolta di dati retrospettivi e longitudinali sulla BMD per descrivere la storia naturale della malattia, al fine di identificare misure di outcome da utilizzare in futuri studi clinici. Per ciascun paziente sarà anche raccolto un campione di DNA che, sfruttando i dati clinici raccolti nei primi due anni del progetto, consentirà di eseguire uno studio di associazione sull'intero genoma (GWAS) per identificare e caratterizzare eventuali modificatori genetici della BMD.

Dati clinici retrospettivi e informazioni sulla mutazione del gene DMD nei pazienti BMD sono stati raccolti da 17 centri neuromuscolari italiani. E' stato costruito un dataset multicentrico con un totale di 856 pazienti. I pazienti sono stati raggruppati per età e secondo il reading frame della mutazione del gene DMD (in-frame o out-of-frame). Il sottogruppo di pazienti portatori di delezioni o duplicazioni esoniche in-frame nel gene DMD è stato ulteriormente classificato in base alla mutazione specifica. Sono state condotte analisi statistiche per confrontare l'età alla perdita della deambulazione (Loss of Ambulation, LoA) e i parametri della funzione muscolare cardiaca e respiratoria in tutti i sottogruppi mutazionali.

Le analisi eseguite hanno mostrato che l'età media alla perdita della deambulazione è di 35,10 anni (IC di 31,58-38,62) con un'età mediana di sopravvivenza alla LoA di 69 anni. Le mutazioni out-of-frame (9%) sono associate a una LoA più precoce ($p<0,001$). Confrontando i vari sottogruppi mutazionali, abbiamo osservato che le delezioni 45-49 sono associate a una LoA più precoce ($p<0,001$) e le delezioni N-terminali ($p<0,05$) e 45-48 ($p<0,01$) a una diminuzione della funzione sistolica ventricolare sinistra.

Questi risultati preliminari contribuiscono a definire meglio la storia naturale della BMD. Un dataset in continua espansione e questa ampia coorte di pazienti affetti da BMD offrono un grande potenziale per la preparazione di futuri e solidi studi clinici.

Disease Name:

Becker muscular dystrophy

Nome malattia:

Distrofia muscolare di Becker

Project number:

GUP21008

4. IDENTIFICATION OF NEW BIOMARKERS MONITORING DMD PATHOLOGY AND RESPONSE TO TREATMENT

Dumitras A.G.*^[1], Piccoli G.^[1], Nogara L.^[1], Kruger M.^[2], Blaauw B.^[1]

^[1]Venetian Institute of Molecular Medicine ~ Padova ~ Italy, ^[2]CECAD ~ Cologne ~ Germany

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a severe disease leading to muscle wasting and premature death. DMD is caused by either mutation of the dystrophin gene disrupting the open reading frame or deletions producing a shortened but still functional dystrophin i.e. Becker muscular dystrophy (characterized by a milder phenotype with a later onset)¹. Even though most of DMD patients lack completely of the dystrophin protein, the onset and the severity of the pathology can be extremely heterogeneous ranging from the first decade to twenty years of age. Advances in therapeutic approaches increased the survival of DMD patients over time, however the development of new drugs has been challenging due to difficulties in assessing their efficacy. This project proposes a novel method for the identification and the validation of novel blood biomarkers directly linked to the muscle state². The tool of choice revolves around the generation of a novel transgenic dystrophic mouse model. MDX animals, lacking the dystrophin protein are crossed with animals expressing a mutated methionyl-tRNA synthetase³ (MetRS animals) under the control of a muscle specific Cre-loxP system. In this way, MetRS mice incorporate the artificial amino acid (ANL) in substitution of the natural methionine into elongating peptide chains. The ANL azido group can be used as a chemical tag and makes possible the visualization and the identification of newly synthesized proteins specifically in skeletal muscle fibers through click chemistry-based techniques. Preliminary results showed an efficient labelling in skeletal muscle fibers upon ANL administration. ANL-containing proteins, were both identified through western blot techniques and visualized on muscle cryosections through immunofluorescence. Moreover, combining click chemistry to immunoprecipitation and subsequently Mass Spectrometry analysis we obtained an enrichment of 800-1000 proteins in MetRS mice. The advantage of this tool extends to the ability to monitor labelled proteins secreted from skeletal muscle and circulating through the blood. Analysis of blood serum and liver of these animals, showed indeed an increased amount of labelled proteins in MetRS-MDX mice when compared to wild type confirming the sensitivity of this method and its potentials for the identification of muscle proteins synthesized and secreted in specific time-windows. The identification of muscle proteins in MetRS-MDX blood serum at different time points, in particular at 3 weeks old mice at the first wave of degeneration and once the muscle pathology is well established (at four months) can be used to establish both degeneration biomarkers and how these proteins change in response to treatment or physical exercise⁴. In conclusion, results coming from MetRS-MDX mouse models will be compared to the serum coming from DMD patients to determine which biomarkers can be used in clinical trials to establish the efficacy of a therapeutic approach.

La distrofia muscolare di Duchenne è una malattia rara ereditaria legata al cromosoma X che porta a progressivo deterioramento dei muscoli scheletrici. I primi sintomi della malattia insorgono nei primi anni di vita, impedendo le normali attività motorie dei pazienti fino ad arrivare a problemi cardiaci e respiratori che risultano il motivo più comune di decesso. Tale malattia è dovuta alla mutazione del gene della distrofina, proteina contenuta nelle cellule muscolari che svolge importanti attività come ancorare la membrana della fibra muscolare alla matrice extracellulare. La perdita della distrofina porta quindi alla morte delle fibre (cellule) muscolari che successivamente vengono sostituite da cellule fibrotiche prive di capacità di contrazione. Sintomi come l'ipostenia e l'atrofizzazione dei muscoli volontari peggiorano progressivamente in concomitanza con la sostituzione del tessuto muscolare con quello fibrotico. Ad oggi la diagnosi viene fatta sulla base di biomarcatori come i livelli di creatin chinasi, un enzima che aumenta fino a 100 volte di più in presenza della malattia, rilevabile dopo l'insorgere dei sintomi. Questo progetto ha come obiettivo principale quello di cercare biomarcatori che permettano una diagnosi precoce della malattia e allo stesso tempo permettano di monitorarne il progresso in base al trattamento terapeutico. A

questo scopo, nel nostro laboratorio abbiamo creato una linea murina che contemporaneamente simuli la distrofia muscolare ed esprima un enzima modificato capace di far incorporare nelle proteine muscolari un aminoacido sintetico. Questo aminoacido viene inserito nelle proteine in maniera esclusiva a livello delle cellule muscolari, e così può essere usato per identificare biomarcatori che vengono secreti dal muscolo nel circolo sanguigno persino molto prima dell'insorgenza dei primi sintomi. I primi esperimenti hanno dimostrato che questo modello murino è efficace nel visualizzare cosa viene secreto dal muscolo nel siero e conseguentemente quali proteine muscolari arrivano al fegato. Il nostro obiettivo consiste nell'identificare le proteine secrete nel siero del nostro modello murino e confrontarle con quelle di pazienti distrofici per avere una lista di biomarcatori utili per la diagnosi. Infine, i candidati ideali, monitorati in momenti diversi del trattamento, saranno utili per capirne l'efficacia.

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophy

Nome malattia:

Distrofia muscolare di Duchenne

Project number:

GMR22T1035

5. DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE: CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

Leone D.^[1], Berardinelli A.L.^[2], Passamano L.^[3], Masson R.^[4], D'Amico A.^[5], Comi G.P.^[6], Pini A.^[7], Battini R.^[8], Sansone V.^[9], Messina S.^[10], Bruno C.^[11], Pegoraro E.^[12], Gandossini S.^[13], Ricci F.^[14], Previtali S.C.^[15], Mercuri E.^[1]

^[1]Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS ~ Roma ~ Italy, ^[2]Fondazione Istituto Nazionale, Neurologico Irccs "C. Mondino" ~ Pavia ~ Italy, ^[3]Dip. Med Sperimentale Cardiomiologia e Genetica Medica ~ Napoli ~ Italy, ^[4]Fondazione Irccs Istituto Neurologico "C. Besta" ~ Milano ~ Italy, ^[5]Dip. Neuroscienze, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù ~ Roma ~ Italy, ^[6]UOC Neurologia, Irccs Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore ~ Milano ~ Italy, ^[7]IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche, Ospedale Bellaria ~ Bologna ~ Italy, ^[8]Dip. Neuroscienze dello Sviluppo, Irccs Fondazione Stella Maris ~ Calambrone (PI) ~ Italy, ^[9]Centro Clinico NEMO Fondazione Serena Onlus, ~ Milano ~ Italy, ^[10]Dip. Neuroscienze, Policlinico Universitario di Messina ~ Messina ~ Italy, ^[11]Dip. Neuroscienze e Riabilitazione, Istituto "G. Gaslini" ~ Genova ~ Italy, ^[12]Dip. Neuroscienze Università degli Studi ~ Padova ~ Italy, ^[13]Unità Neuromusc, Dip. Neuroriabilitazione, Irccs "E. Medea", Bosisio Parini (LC) ~ LECCO ~ Italy, ^[14]Dip Scienze Pediatriche, SC Neuropsichiatria Infantile, AOU Città della Salute e della Scienza, ~ Torino ~ Italy, ^[15]Fondazione Centro San Raffaele, Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele, Milano ~ MILANO ~ Italy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive disease caused by mutation in the dystrophin gene, affecting 1 in 3600 live male births. DMD is usually first diagnosed between the age of 3 and 5 years and subsequently, generally after the age of 7 years there is a decline of abilities with a predictable pattern of loss of specific functional milestones. Improved standards of care and the regular early use of glucocorticoid (GC) treatment have changed the natural history of the disease, affecting both survival and the time of loss of functional milestones. Other studies reporting 3 years longitudinal prospectively data changes using the same measures did not provide any information on the different genotypes. Since the 3 year study was published in 2015 (9), thanks to a grant by the Italian Telethon, the centers involved in the 3 year follow up study have been collecting additional data using the same criteria and the same structure used in the original study. The aims of this project are:

1) To develop a structured electronic CRF (eCRF) that will include the functional data (6MWT, NSAA, timed

tests, PUL) collected as part of the clinical research study and other clinical and genetic variables not included in the original study but routinely collected and available from clinical notes;

- 2) to transfer the existing data, partly (functional measures) available on electronic datasets partly on clinical notes to the newly developed eCRF;
- 3) to analyse 3 years data from the new dataset that now includes over 200 patients including the 98 patients in the original 3 year data set and the newly recruited ones;
- 4) to analyse longer term follow up in the original cohort and in all those who have more than 3 year follow up;
- 5) to establish phenotype genotype correlation, looking specifically to groups of deletions amenable to skip exon 44,45, 51 and 53;
- 6) to analyse in the patients who lost ambulation their retrospective functional data looking for possible prognostic indicators at one, two and three years before loss of ambulation (LOA);
- 7) to perform, when DNA is available, further analysis to assess the known gene modifiers (osteopontin, LPT4, etc.) (15,16)

The study will involve all patients with genetically confirmed DMD diagnosis previously/currently part of follow up studies in our and 13 other centers of the Italian DMD clinical network. These patients have been part of different consecutive head to head clinical studies since 2009 and have been longitudinally assessed by trained physiotherapist. The first 3 years results of this study have already been published. The study will include two parts run in parallel in the first 12-18 months devoted to the development of an eCRF and to data completion and entry, and a third part for data analysis.

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia progressiva causata da mutazioni nel gene della distrofina, che colpisce 1/3600 maschi vivi. Viene solitamente diagnosticata tra i 3 ei 5 anni e successivamente, generalmente dopo i 7 anni, si assiste ad un declino delle abilità con un pattern prevedibile di perdita di specifiche tappe funzionali motorie. Negli ultimi decenni la storia naturale della malattia è molto cambiata con l'introduzione della terapia con glucocorticoidi (GC) e dei nuovi standard di cura, con un impatto sia sulla sopravvivenza che sulla perdita delle tappe motorie. Studi precedenti della nostra rete hanno riportato i dati longitudinali prospettici di 3 anni utilizzando le stesse misure funzionali motorie, ma non hanno fornito informazioni sui diversi genotipi. Da quando è stato pubblicato nel 2015 lo studio di 3 anni, grazie a una borsa di studio del Telethon italiano, i centri coinvolti nello studio di follow-up di 3 anni hanno raccolto dati aggiuntivi utilizzando gli stessi criteri e la stessa metodologia dello studio originale.

Gli obiettivi di questo progetto sono:

- Sviluppare una CRF elettronica strutturata (eCRF) che includa i dati funzionali (6MWT, NSAA, test a tempo, PUL) raccolti nell'ambito dello studio di ricerca clinica e altre variabili cliniche e genetiche non incluse nello studio originale ma regolarmente raccolte e disponibili da cartelle cliniche;
- Trasferire i dati esistenti, disponibili in parte su cartelle elettroniche ed in parte su cartelle cliniche sulla nuova all'eCRF in via di sviluppo;
- Analizzare i dati di 3 anni della nuova raccolta dati che ora comprende oltre 200 pazienti tra cui i 98 pazienti della raccolta dati originale di 3 anni e quelli appena arruolati; analizzare il follow-up a più lungo termine nella coorte originale e in tutti coloro che hanno più di 3 anni di follow-up;
- Stabilire la correlazione genotipo/fenotipo, guardando specificamente a gruppi di delezioni che skipano gli esoni 44,45,51 e 53;

-Analizzare nei pazienti che hanno perso la deambulazione i dati funzionali retrospettivi alla ricerca di possibili indicatori prognostici a uno, due e tre anni prima della perdita della deambulazione (LOA);

-Eseguire, quando il DNA è disponibile, ulteriori analisi per valutare i modificatori genetici noti (osteopontina, LPT4, ecc.). Lo studio coinvolgerà tutti i pazienti con diagnosi di DMD geneticamente confermata come parte degli studi di follow-up nel nostro centro ed in altri 13 centri del network italiano DMD. Questi pazienti fanno parte di diversi studi clinici consecutivi iniziati dal 2009 e sono stati valutati longitudinalmente da un fisioterapista addestrato. I primi 3 anni di questo studio sono già stati pubblicati. Lo studio comprende due parti eseguite in parallelo nei primi 12-18 mesi dedicati allo sviluppo di un eCRF e al completamento e all'immissione dei dati, e una terza parte per l'analisi dei dati.^[1]^[2]^[3]^[4]^[5]^[6]^[7]^[8]^[9]^[10]^[11]^[12]^[13]^[14]

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophy

Nome malattia:

Distrofia muscolare di Duchenne

Project number:

GSP20001

6. CHARACTERIZING PHENOTYPES IN NON AMBULANT DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Leone D.*^[1], Palermo C.^[1], Berti B.^[1], Dosi C.^[2], Catteruccia M.^[3], Pedemonte M.^[4], Giannotta M.^[5], Bello L.^[6], Passamano L.^[7], Ricci F.^[8], Zanolini A.^[9], Magri F.^[10], Diella E.^[11], Russo M.^[12], Siciliano G.^[13], Frosini S.^[14], Mercuri E.^[1], Pane M.^[1]

^[1]IRCSS Fondazione Policlinico A.Gemelli ~ Roma ~ Italy, ^[2]Fondazione IRCCS Istituto neurologico Carlo Besta ~ Italy, ^[3]Ospedale Pediatrico Bambino Gesù-IRCCS ~ Roma ~ Italy, ^[4]Istituto Gianna Gaslini -IRCCS ~ Genova ~ Italy, ^[5]Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna-IRCCS ~ Bologna ~ Italy, ^[6]Università di Padova ~ Padova ~ Italy, ^[7]Univ.della Campania ex Seconda Università di Napoli ~ Napoli ~ Italy, ^[8]Università di Torino ~ Torino ~ Italy, ^[9]Centro Clinico Nemo-sede di Milano ~ Milano ~ Italy, ^[10]Fond.IRCCS Ca' Granda-Osp.Maggiore Policlinico ~ Milano ~ Italy, ^[11]Ass.La Nostra Famiglia Eugenio Medea-IRCCS ~ Lecco ~ Italy, ^[12]Università di Messina ~ Messina ~ Italy, ^[13]Univerisità di Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[14]Fondazione IRCCS Stella Maris ~ Pisa ~ Italy

Standard of care in Duchenne Muscular Dystrophy have significantly changed the natural history of the disease and delayed the age at loss of ambulation but there is still no effective cure for the disease. Most of the clinical trials has so far targeted ambulant DMD boys but less attention has been devoted to non- ambulant patients. One of the difficulties in targeting non-ambulant patients is that they are a very heterogeneous group ranging from boys who have just lost ambulation, often still having a good strength in the upper limbs and no obvious clinical signs of respiratory and cardiac impairment to young adults with extremely limited mobility, and variable cardiac and respiratory involvement. This proves to be challenging at the time of selecting possible endpoints or outcome measures to follow these patients both in natural history studies or in interventional trials. Over the last few years several papers have reported the clinical progression of individual functional aspects but there have been few attempts to assess the correlation between the different aspects of progression of the disease and to define how the different aspects relate to each other at different ages. Our project is designed as a large multicenter study involving several Italian centers of tertiary care and will include patients with DMD who have lost the ability of walk independently. The aims of the study are to prospectively collect information on several aspects of

function in non-ambulant DMD patients by using a structured battery of tests including motor, respiratory and cardiac function, to retrospectively review similar information on the data collected in the last decade and to establish the effect of steroids after loss of ambulation on different aspects of function. We also aim to use this integrated approach to identify patterns of severity and progression, the most appropriate outcome measures and endpoints in each group and possible genotype/phenotype correlations.

This study is designed as spontaneous, observational, retrospective, and prospective longitudinal large multicenter study.

Protocols for the investigations proposed are being submitted to each institutions Ethic Committee; the study is ongoing, patients enrollment started on August 2022. Some centers are still waiting for EC approval.

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DEI PAZIENTE CON DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE NON DEAMBULANTI

Gli standard di cura nella distrofia muscolare di Duchenne hanno modificato significativamente la storia naturale della malattia e ritardato l'età alla perdita della deambulazione, ma non esiste ancora una cura efficace per la malattia. La maggior parte degli studi clinici è rivolto ai ragazzi DMD deambulanti, ma meno attenzione è stata dedicata ai pazienti non deambulanti. Una delle difficoltà nello studio dei pazienti non deambulanti è che si tratta di un gruppo molto eterogeneo che va dai ragazzi che hanno appena perso la deambulazione, spesso con ancora una buona forza negli arti superiori e nessun segno clinico evidente di compromissione respiratoria e cardiaca, ai giovani adulti con mobilità estremamente limitata e coinvolgimento cardiaco e respiratorio variabile. Ciò si rivela impegnativo al momento della selezione di possibili endpoint o misure di outcome per il follow-up di questi pazienti sia negli studi di storia naturale che negli studi interventistici. Negli ultimi anni diversi lavori hanno riportato la progressione clinica dei singoli aspetti funzionali ma sono stati pochi i tentativi di valutare la correlazione tra i diversi aspetti di progressione della malattia e di definire come i diversi aspetti si relazionano tra loro nelle diverse età. Il nostro progetto è concepito come studio multicentrico che coinvolge diversi centri di riferimento in Italia e includerà pazienti con DMD che hanno perso la capacità di camminare autonomamente. Gli obiettivi dello studio sono raccogliere in modo prospettico informazioni su diversi aspetti della funzione in pazienti con DMD non deambulanti utilizzando una batteria strutturata di test che include la funzione motoria, respiratoria e cardiaca, per esaminare retrospettivamente informazioni simili sui dati raccolti nell'ultimo decennio e stabilire l'effetto degli steroidi dopo la perdita della deambulazione su diversi aspetti della funzione. L'obiettivo è anche quello di utilizzare questo approccio integrato per identificare i modelli di gravità e progressione, le misure di outcome e gli endpoint più appropriati in ciascun gruppo e le possibili correlazioni genotipo/fenotipo.

Questo studio è concepito come un studio multicentrico longitudinale di storia naturale, osservazionale, retrospettivo e prospettico.

I protocolli per le indagini proposte state presentate al Comitato Etico di ciascuna istituzione; alcuni centri sono ancora in attesa dell'approvazione del CE.

Lo studio è iniziato ad Agosto 2022 ed è attualmente in fase di arruolamento dei pazienti.

1)Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. Birnkrant DJ et al. Lancet Neurol. 2018 Mar;17(3):251-267. Rev

2) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. David J Birnkrant et al.Lancet Neurol. 2018 Apr;17(4)

3)Longitudinal natural history in young boys with Duchenne muscular dystrophy. Coratti G, et al. Neuromuscul Disord. 2019 Nov;29(11):857-862.

4) Benefits of glucocorticoids in non-ambulant boys/men with Duchenne muscular dystrophy: A multicentric longitudinal study using the Performance of Upper Limb test. Pane M. et al Neuromuscul Disord. 2015 Oct;25(10)

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophy

Nome malattia:

Distrofia muscolare di Duchenne

Project number:

GUP21003

7. CHARACTERIZATION OF THE PHENOTYPIC DIVERSITY IN DUPEX2 DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND IDENTIFICATION OF PREDICTIVE/PROGNOSTIC MARKERS

Zambon A.^[1], Ferlini A.^[3], Albamonte E.^[2], Astrea G.^[4], Comi G.^[5], D'Amico A.^[6], D'Angelo M.G.^[7], Fiorillo C.^[8], Masson R.^[9], Messina S.^[10], Pane M.^[11], Passamano L.^[12], Pegoraro E.^[13], Pini A.^[14], Ricci F.^[15], Previtali S.*^[1]

^[1]OSPEDALE SAN RAFFAELE ~ MILANO ~ Italy, ^[2]CENTRO CLINICO NEMO ~ MILANO ~ Italy, ^[3]UNIVERSITÀ DI FERRARA ~ FERRARA ~ Italy, ^[4]IRCCS Fondazione Stella Maris ~ PISA ~ Italy, ^[5]Irccs Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Milano ~ MILANO ~ Italy, ^[6]Ospedale Pediatrico Bambino Gesù ~ ROMA ~ Italy, ^[7]Irccs "E. Medea" ~ BOSISIO PARINI ~ Italy, ^[8]Istituto "G. Gaslini" ~ GENOVA ~ Italy, ^[9]Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta ~ MILANO ~ Italy, ^[10]Policlinico Universitario di Messina ~ MESSINA ~ Italy, ^[11]Università Cattolica del Sacro Cuore ~ ROMA ~ Italy, ^[12]Dip. Medicina Sperimentale Cardiomiologia e Genetica Medica ~ NAPOLI ~ Italy, ^[13]Dip. Neuroscienze Università degli Studi ~ PADOVA ~ Italy, ^[14]IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche ~ BOLOGNA ~ Italy, ^[15]Dip Scienze Pediatriche ~ TORINO ~ Italy

Duplication of exon 2 (Dup2) results in a frameshift leading to complete loss of the dystrophin protein and thus expected severe Duchenne muscular dystrophy (DMD), as confirmed by several studies. Dup2 is the most common duplication in the DMD gene and therapies directed at restoring expression of either full-length dystrophin or nearly full-length dystrophin through utilization of the DMD exon 5 internal ribosome entry site (IRES) have reached human application. To determine the efficacy of such treatments it is pivotal to clarify the natural history of Dup2, particularly considering that there are anecdotal reports of Dup2 individuals presenting with a milder course. Our aim, in this Italian multicenter study, is to describe the phenotypic spectrum of dystrophinopathy in a large cohort of Italian Dup2 patients and try to decipher the molecular mechanism underlying such heterogeneity.

We already performed a retrospective observational study by analyzing data from two large genotype-phenotype databases (Italian-DMD network and American UDP network). We recruited 66 Dup2 subjects in whom we observed that loss of ambulation (LOA) differed significantly between Dup2 DMD subjects and historical non-Dup2 DMD controls ($p < 0.001$), particularly when corticosteroid -treatment was administered. Descriptively, respiratory function seemed to be preserved for longer in Dup2 patients compared to what expected in DMD, possibly related to later age at LOA. Moreover, even within the Dup2 DMD cohort we observed in a consistent number of patients that the disease is further milder.

Ongoing studies will evaluate longitudinal progression of the Italian-DMD network, which is a crucial aspect as considering that new treatments are likely to change the rate of deterioration rather than "cure" the disease. Our final attempt is to reveal mechanisms involved in attenuating

the phenotype of Dup2 DMD by genomic and expression studies.

Caratterizzazione fenotipica di pazienti con distrofia muscolare di Duchenne causata da duplicazione dell'esone 2 ed identificazione di fattori predittivi e prognostici

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia X-linked caratterizzata dal progressivo deterioramento dei muscoli scheletrici, cardiaco e respiratori. La perdita della deambulazione autonoma si osserva tra i 10 e 14 anni. La Duchenne è causata da diverse mutazioni nel gene della distrofina e l'11% di queste sono duplicazioni. Le terapie più promettenti ad oggi sono quelle mirate a correggere il difetto genetico con farmaci specifici per ogni singola mutazione. È importante però sottolineare che non tutti i pazienti presentano la stessa evoluzione clinica, e recenti studi dimostrano come il genotipo possa avere un ruolo nel determinare un differente decorso. È quindi fondamentale raccogliere maggiori informazioni riguardo alla correlazione genotipo-fenotipo e il pattern di progressione associato a mutazioni differenti. La duplicazione dell'esone 2 (Dup2) è la duplicazione più comune, e l'unica per la quale uno studio di fase I/IIa sia già in atto su pazienti. Per le sue caratteristiche, e in linea con quanto descritto fino ad oggi, la Dup2 è associata con un classico fenotipo DMD. Tuttavia, sparuti studi hanno riportato pazienti più lievi (in grado di camminare oltre i 13 anni di età). Abbiamo quindi identificato tutti i pazienti Dup2 seguiti in centri di terzo livello in Italia. Studi preliminari suggeriscono come una percentuale non trascurabile di questi pazienti abbia un fenotipo più lieve, non spiegato dalle correnti conoscenze. Un primo tentativo di dimostrare il meccanismo molecolare in grado di attenuare il genotipo sembra confutare l'ipotesi che questo risieda nello splicing alternativo a valle dell'esone 5, già dimostrato in pazienti con delezione dell'esone 2. In questo studio ci proponiamo di completare una dettagliata caratterizzazione clinica dei pazienti con Duplicazione 2, e di identificare il meccanismo alla base di un quadro clinico di minore gravità presente in alcuni di questi pazienti.

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophy

Nome malattia:

Distrofia muscolare di Duchenne

Project number:

GUP21006

8. INHIBITION OF COMPLEMENT C1 AMELIORATES THE DYSTROPHIC MUSCLE PHENOTYPE OBSERVED IN A MOUSE MODEL OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Florio F.^[1], Vencato S.^[1], Mathur V.^[2], Andrews--Zwilling Y.S.^[2], Papa F.T.^[1], Libergoli M.^[1], Kheir E.^[1], Ghzaiei I.^[1], Yednock T.^[2], Torrente Y.^[3], Biressi S.^[1]

^[1]University of Trento ~ Trento ~ Italy, ^[2]Annexon Biosciences ~ South San Francisco ~ United States of America,

^[3]Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy

Elevated WNT-signaling has been shown to play a detrimental role in muscle regeneration and to promote the accumulation of fibrotic tissue in dystrophic muscles. However, the molecular and cellular pathways responsible for this process are poorly characterized. The initiating molecule of the classical complement pathway, C1q was reported to activate canonical WNT-signaling in aged mice. We hypothesized that the C1 complex (C1q with serine proteases C1r and C1s) induces

WNT-signaling in Duchenne muscular dystrophy to exacerbate the disease. Consistent with this hypothesis, we found that classical complement protein levels were elevated up to 10-fold as early as one month of age and remain elevated up to one year of age in the dystrophic mdx muscles compared to the healthy controls. The analysis of human biopsies confirmed these results. Macrophages and fibro-adipogenic progenitors were increased in the mdx muscles proximal to the regenerating areas and secreted distinct subunits of the C1 complex (i.e., C1q and C1r/s, respectively). These complement protein levels positively correlated with the increased expression of WNT-target proteins in the mdx regenerating areas. Further, C1 complex induced WNT-signaling in murine fibroblasts and myoblasts in vitro. The in vivo pharmacological inhibition of C1r/s led to a reduced expression of canonical WNT and fibrogenic genes in the dystrophic fibro/adipogenic progenitor cells, reduced collagen deposition and reduced fibrosis. Further, the in vivo inhibition of C1q with an anti-C1q antibody rescued the behavioral phenotype in mdx mice after 2 weeks of treatment and mdx mice in which C1qa was genetically ablated showed improved muscle resistance compared to the mdx control mice. Our data support the idea that complement is detrimental in the dystrophic environment and that inhibition of the classical complement pathway can represent a novel therapeutic strategy to delay the progression of Duchenne muscular dystrophy.

L'inibizione del complemento C1 migliora il fenotipo muscolare distrofico osservato in un modello murino di distrofia muscolare di Duchenne

Precedentemente è stato dimostrato dal nostro laboratorio che un'elevata attivazione della via di trasduzione del segnale di WNT svolge un ruolo dannoso nella rigenerazione muscolare e promuove l'accumulo di tessuto fibrotico nei muscoli distrofici. Tuttavia, le vie molecolari e cellulari responsabili di questo processo sono scarsamente caratterizzate. Basandoci su evidenze condotte in modelli murini di invecchiamento, abbiamo ipotizzato che il complesso del complemento C1 (C1q con serina proteasi C1r e C1s) possa indurre l'attivazione del WNT nella distrofia muscolare di Duchenne esacerbando la malattia. Coerentemente con questa ipotesi, abbiamo scoperto che i livelli di proteine del complemento sono elevati fino a dieci volte già a un mese di età e rimangono elevati fino a un anno di età nei muscoli di topi distrofici rispetto ai controlli sani. L'analisi delle biopsie umane ha confermato questi risultati. Questi livelli di proteina correlavano positivamente con l'aumentata espressione delle proteine indotte da WNT nelle aree di rigenerazione muscolare nei modelli distrofici. Inoltre, il complesso C1 è capace di indurre la attivazione della via di trasduzione del segnale di WNT nei fibroblasti e nei mioblasti murini in vitro. L'inibizione farmacologica in vivo di C1r/s porta a una ridotta espressione di WNT, di geni fibrogenici nelle cellule progenitrici fibro/adipogeniche distrofiche, e a una ridotta deposizione di collagene e fibrosi muscolare. Inoltre, l'inibizione in vivo di C1q con un anticorpo anti-C1q ha migliorato il fenotipo comportamentale nei topi distrofici. Questo miglioramento trova ulteriore conferma in topi distrofici in cui C1qa è stato eliminato geneticamente e che mostrano una migliore resistenza muscolare rispetto ai topi di controllo. I nostri dati supportano l'idea che l'inibizione della via classica del complemento possa rappresentare una nuova strategia terapeutica per ritardare la progressione della distrofia muscolare di Duchenne.

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophy

Nome malattia:

Distrofia muscolare di Duchenne

Project number:

TCP13007

9. INSTRUCTING ER-PHAGY TO COUNTERACT MUSCLE DISEASES

Buonomo V., Reggio A., Cirillo C., Grumati P.*

TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy

The sarcoplasmic reticulum (SR) can be functionally defined as a specialized form of the endoplasmic reticulum (ER) dedicated to Ca²⁺ storage and release with respect to regulation of muscle contraction. Despite its relevant physiological function, little is known on the molecular mechanisms responsible for the organization of SR structure. ER-phagy refers to the autophagy-dependent removal of discrete portions of the ER, a cellular mechanism that contributes to preserve cell and tissue homeostasis as well as modulates ER shape and structure. ER functions and autophagy are progressively dampened during ageing and critically fails in several forms of muscle atrophy and muscular dystrophies. Considering the central role of autophagy and sarcoplasmic reticulum (SR) in skeletal muscle homeostasis, ruinous outcomes observed in muscle diseases, may be caused by an ER-phagy imbalance. ER stress, accumulation of misfolded proteins and autophagy impairment are common hallmarks in several muscular dystrophies. ER stress markers are increased in mdx mice as well as in muscle biopsies from DMD patients. Contextually, autophagic impairments have also been reported and autophagy modulating agents have been proven valuable in reducing myofibrillar damage in mdx/DMD muscles. Therefore, ER/SR homeostasis and intact autophagy flux are both essential to preserve muscle structure and fitness. Alterations observed in muscle disorders, like DMD, seem to be attributable, at least partially, to a defect in the turnover of dysfunctional SR via ER-phagy, which recently emerged as a critical regulator of cellular behavior. However, its role in muscle homeostasis remains largely elusive; thus, limiting the use of ER-phagy-targeted interventions to mitigate muscle disease.

Il reticolo sarcoplasmatico (RS) può essere funzionalmente definito come una forma specializzata del reticolo endoplasmatico (RE) dedicata all'immagazzinamento e al rilascio di Ca²⁺ durante la contrazione muscolare. Nonostante la sua rilevante funzione fisiologica, si sa poco sui meccanismi molecolari responsabili dell'organizzazione della struttura del RS. Con il termine ER-phagy si definisce la rimozione, dipendente dall'autofagia, di porzioni discrete del RE, un meccanismo cellulare che contribuisce a preservare l'omeostasi delle cellule e dei tessuti e modula la forma e la struttura del RE. Le funzioni del RE e l'autofagia vengono progressivamente attenuate durante l'invecchiamento e falliscono in modo critico in diverse forme di atrofia muscolare e distrofie muscolari. Considerando il ruolo centrale dell'autofagia e del RS nell'omeostasi del muscolo scheletrico, gli esiti rovinosi osservati nelle malattie muscolari, possono essere causati da uno squilibrio dell'ER-phagy. Lo ER stress, l'accumulo di proteine e la compromissione dell'autofagia sono segni distintivi comuni in diverse distrofie muscolari. I marcatori di ER stress sono aumentati nei topi mdx così come nelle biopsie muscolari dei pazienti affetti da DMD. Contestualmente, sono state evidenziate anche anomalie del flusso autofagico. Il ripristino del corretto flusso autofagico si è dimostrato un fattore determinante nel ridurre il danno miofibrillare nei muscoli mdx/DMD. Pertanto, l'omeostasi ER/SR e il flusso autofagico intatto sono entrambi essenziali per preservare la struttura muscolare e la forma fisica del muscolo scheletrico. Le alterazioni osservate nei disturbi muscolari, come nella DMD, sembrano essere attribuibili, almeno in parte, a un difetto nel turnover del RS disfunzionale, tramite ER-phagy. Tuttavia, il suo ruolo nell'omeostasi muscolare rimane in gran parte inesplorato limitando l'uso di interventi mirati sull'ER-phagy per mitigare la patologia muscolare.

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophies

Nome malattia:

Distrofia Muscolare di Duchenne

Project number:

TGM22MFU14

10. A MITOCHONDRIAL THERAPY FOR MUSCULAR DYSTROPHIES

Castagnaro S.*^[1], Bonaldo P.^[1], Dorchies Olivier M.^[2], Cohen M.^[3], Bernardi P.^[1]

^[1]Università di Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]University of Geneva ~ Geneva ~ Switzerland, ^[3]Oregon Health & Science University ~ Portland (OR) ~ United States of America

We will test if mitochondrial dysfunction mediated by pathological opening of the permeability transition pore (PTP) [1] can be reversed by high-affinity, triazole-based small molecule PTP inhibitors (TR001, TR002 and their prodrugs Pro-TR001 and Pro-TR002). Efficacy will be tested in two mouse disease models: (i) the Col6a1^{-/-} mouse lacking collagen (col) VI, a model of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy and Bethlem Myopathy; and (ii) the mdx5Cv mouse lacking dystrophin, a model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). Potential liabilities will be assessed through a panel of established in vitro assays for off-target effects. Solid evidence indicates that PTP-dependent mitochondrial dysfunction plays a key role in many forms of muscular dystrophy. The triazoles under study (i) are extremely effective in a Zebrafish model of colVI myopathy [2] and in the sapje Zebrafish lacking dystrophin, a severe model of DMD [3]; and (ii) restore defective respiration in sapje Zebrafish and in myoblasts and myotubes from dystrophic patients [3]. This program could provide a novel treatment for muscular dystrophies and stimulate the testing and application of the “mitochondrial therapy” to other diseases where aberrant PTP activation is part of the pathogenic cascade. Our treatment could also be used in combination with drugs that act on different steps in disease onset and progression, a combinatorial approach that could be key to therapeutic success.

Una terapia mitocondriale per le distrofie muscolari

I mitocondri sono le nostre centrali energetiche, la sede della respirazione cellulare dove viene prodotta la maggior parte dell'ATP, la “moneta” energetica. I mitocondri possiedono un canale (il poro di transizione della permeabilità, PTP) che, se si apre in modo inappropriato, causa un corto circuito che compromette la contrattilità muscolare e causare la morte precoce delle fibre [1]. Il PTP viene attivato dallo stress ossidativo e dall'eccesso di calcio, due fattori fondamentali implicati nella patologia delle fibre muscolari. Abbiamo sviluppato dei composti triazolici di grande potenza efficaci sia nella cura di pesciolini affetti da miopatia del collagene (col) VI [2] e dalla malattia equivalente alla distrofia muscolare di Duchenne (DMD), che nel recupero della respirazione, altrimenti difettiva, in fibre muscolari ottenute da pazienti [3]. In questo studio intendiamo stabilire la farmacodinamica e l'efficacia dei triazoli in due modelli murini di malattia, (1) il topo Col6a1^{-/-} a cui manca il colVI, un modello della distrofia Ullrich e della miopatia di Bethlem e (2) il topo mdx5Cv privo di distrofina, un modello della DMD. I potenziali effetti collaterali verranno anche valutati attraverso saggi validati da numerosi studi. Il programma potrebbe portare a un trattamento delle distrofie muscolari e stimolare studio e applicazione della “terapia mitocondriale” ad altre malattie in cui i mitocondri sono parte del meccanismo di insorgenza. Il nostro trattamento può essere usato in combinazione con altri farmaci o strumenti genetici che agiscono su aspetti diversi nelle insorgenza o progressione della malattia, un approccio combinatorio che potrebbe essere la chiave del successo terapeutico.

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

2. Šileikyte J, Devereaux J, de Jong J, Schiavone M, Jones K, Nilsen A, Bernardi P, Forte M & Cohen M (2019) Second generation inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore with improved plasma stability. *ChemMedChem* 14, 1771-1782.

3. Stocco A, Smolina N, Sabatelli P, Šileikyte J, Artusi E, Mouly V, Cohen M, Forte M, Schiavone M & Bernardi P (2021) Treatment with a triazole inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore fully corrects the pathology of sapje zebrafish lacking dystrophin. *Pharmacol Res* 165, 105421.

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophy; Ullrich Congenital Muscular Dystrophy

Nome malattia:

Distrofia muscolare di Duchenne; Distrofia muscolare congenita di Ullrich

Project number:

GMR22T2016

11. AT THE ORIGIN OF CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY: SHEDDING LIGHT ON THE TDARK PROTEINS DPM2 AND DPM3

Villa C.^[1], Torrente Y.*^[1], Saponaro A.^[2]

^[1]*Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy*, ^[2]*Department Biosciences, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy*

α -Dystroglycanopathy is a newly emerging subgroup of congenital muscular dystrophies caused by the aberrant glycosylation of α -Dystroglycan (α DG). A defective glycosylation of α DG determines severe muscle damage/degeneration, intellectual disability, epilepsy, and cardiomyopathy. At the origin of glycosylation of α DG there are three proteins, named DPM1, 2 and 3, that form the enzyme dolichol-phosphate mannose (DPM) synthase. Mutations in the genes encoding for DPM2 and DPM3 are indeed associated with defective glycosylation of α DG, and thus with rare congenital muscular dystrophies, together with a complex spectrum of neurological disorders. DPM synthase is a poorly studied enzyme, and even more obscure is the current state of knowledge concerning DPM2 and DPM3 subunits, which are indeed classified as Tdark proteins since their structure, function, interacting molecules and drugs are unknown. The aim of this project is to fill these gaps by describing, at molecular and cellular level, DPM synthase to exhaustively understand the link occurring between DPM2/3 mutations and the development of α -Dystroglycanopathies. This aim will be achieved by I) solving the 3D structure of DPM synthase, in the absence and in the presence of its substrates, by means of cutting edge single particle cryo-electron microscopy (cryo-EM); II) testing with biochemical assays if DPM2/3 mutations affect the interaction between the subunits of the enzyme and/or between the enzyme and its substrates; iii) comparing proteomics between healthy control and DPM2/3 mutated neurons and myocytes to identify target proteins of DPM2/3 whose binding is affected by mutations, thus correlating the pathological effects of DPM2/3 mutants with cell-specific signalling pathways. Of note that, since DPM2/3 mutations are associated to rare syndromes, we will reprogram healthy donor fibroblasts into induced pluripotent stem cells (iPSCs). An innovative optogenetic CRISPR/Cas9 system will be used to edit DPM2/3 genes. The results of this study will pose the necessary basis for novel therapies targeting this newly emerging subgroup of congenital muscular dystrophies.

Le alfa distroglicanopatie sono una nuova classe di distrofie muscolari congenite causate da un deficit di glicosilazione della proteina alfa distroglicano (α DG). La glicosilazione, e cioè il processo che porta all'associazione di carboidrati alle molecole, è cruciale per il ruolo di α DG, che è quello di fare da ponte tra le cellule e la matrice nella quale sono immerse. Questa connessione è necessaria per la corretta organizzazione dei tessuti. Inoltre, α DG, permettendo l'adesione delle cellule alla matrice, protegge le cellule muscolari dai danni indotti dalla loro contrazione. Difetti nella glicosilazione di α DG causano, infatti, il danneggiamento e la conseguente degenerazione del tessuto muscolare, disabilità mentali, epilessie e cardiopatie.

La glicosilazione è un processo complesso e coinvolgente svariate proteine, le quali lavorano in sinergia e con una sequenza spazio-temporale precisa. All'origine del processo di glicosilazione di α DG vi sono tre proteine, DPM1, 2 e 3, che formano l'enzima Mannosio Dolicol-Fosfato (DPM) sintasi. Mutazioni nei geni che codificano per DPM2 e DPM3 sono associate a difetti nella glicosilazione della proteina α DG e di conseguenza allo sviluppo di distrofie muscolari congenite, assieme ad un complesso spettro di disordini neurologici.

L'enzima DPM sintasi è molto poco studiato e ancora meno lo sono le subunità DPM2 e DPM3, che sono, infatti, classificate come "Tdak" e cioè proteine la cui struttura, funzione e molecole/farmaci regolatori sono ignoti. Di conseguenza, il ruolo patogenetico delle mutazioni di DPM2 e DPM3 rimane ignoto.

Lo scopo del presente progetto è proprio quello di colmare tali lacune andando a descrivere, a livello molecolare e cellulare, l'enzima DPM sintasi al fine di chiarire la connessione esistente tra le mutazioni di DPM2 e DPM3 e lo sviluppo delle alfa distroglicanopatie. I risultati dello studio potranno le basi per lo sviluppo di terapie contro questa nuova classe di distrofie muscolari congenite.

Disease Name:

Muscular Dystrophies, congenital

Nome malattia:

Distrofie muscolari congenite

Project number:

GJC21084

12. SPERMIDINE AS NEW CANDIDATE FOR THE TREATMENT OF COL6 MYOPATHIES

Gambarotto L.*^[1], Metti S.^[1], Castagnaro S.^[1], Aita A.^[4], Baraldo M.^[3], Sabatelli P.^[2], Arrigoni G.^[3], Blaauw B.^[3], Cescon M.^[1], Pegoraro E.^[5], Basso D.^[4], Bonaldo P.^[1]

^[1]Department of Molecular Medicine, University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli ~ Bologna ~ Italy, ^[3]Department of Biomedical Sciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[4]Laboratory Medicine Unit, University Hospital of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[5]Department of Neurosciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy

Collagen VI-related myopathies (COL6-RM), such as Ullrich congenital muscular dystrophy (UCMD) and Bethlem myopathy (BM), are a distinct group of inherited muscle disorders caused by mutations of COL6 genes and characterized by early-onset muscle weakness, for which no cure is available yet [1,2]. The Col6a1 knockout (KO) mouse model allowed identify key pathophysiological mechanisms underlying COL6-RM, including impaired autophagy, myofiber apoptosis, mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction fragmentation [3-6].

We previously demonstrated that targeting autophagy through pharmacological or dietary approaches is a promising strategy to ameliorate muscle defects [4,5,7-9]. In this project we

exploited the in vivo and in vitro models of COL6-RM closest to clinical translation that we developed through years [2,6,8-10], and investigated the non-toxic nutraceutical spermidine (Spd) in COL6 KO mice and in cell cultures of UCMD/BM patients. Our results show that a 100-day-long per os administration of 30 mM Spd in COL6 KO mice is highly effective in inducing autophagic and mitophagic fluxes, leading to recovery of muscle strength, with also a beneficial impact on mitochondria ultrastructure and neuromuscular junction integrity [11].

Our past work showed that the key downstream defects identified in COL6 KO mice are also present in patients' muscle biopsies and muscle cell cultures. Although skin fibroblasts were extensively used for studying the primary COL6 defect in UCMD and BM patients, nothing was known about downstream affected cellular and molecular pathways in such in vitro model. By demonstrating the presence of apoptotic, signaling and autophagy-related defects in patients' skin fibroblasts, we now open the field for the use of this non-invasive model for investigating and monitoring therapeutic approaches.

Moreover, we validated the use of peripheral blood mononuclear cells as a non-invasive tool for monitoring the efficacy of Spd in activating autophagy. Finally, by proteomic studies we identified a set of protein biomarkers differentially expressed in extracellular vesicles isolated from wild-type and COL6 KO primary muscle fibroblasts, and we validated them in skin fibroblast derived from BM/UCMD patients.

These results are relevant in the context of COL6-RM pre- and clinical research, as up to now only muscle biopsies and freshly isolated myogenic cultures were used to evaluate specific outcomes measures responding to treatments. Our preclinical data on Spd in vivo and in vitro effects (autophagy induction, safe tolerability in animals, muscle strength recovery) strongly support the benefits for Spd and related nutraceuticals as a therapeutic option for UCMD and BM patients. Altogether, these results provide a strong rationale for the application of Spd in prospective clinical trials as a ready-translatable nutritional supplementation.

La distrofia muscolare congenita di Ullrich (UCMD) e la miopatia di Bethlem (BM) sono patologie muscolari ereditarie causate da mutazioni nei geni per Collagene VI (COL6); esse sono caratterizzate da debolezza muscolare precoce e progressiva, e non ci sono attualmente cure o terapie disponibili [1, 2]. Un valido modello di tali patologie è rappresentato dal topo privo di COL6 (COL6 KO), il quale ha permesso di identificare le alterazioni patomolecolari chiave alla base della malattia, comprendenti deficit autofagico, disfunzione mitocondriale e apoptosi delle miofibre [3-6]. In studi precedenti avevamo dimostrato che approcci farmacologici o nutrizionali in grado di riattivare l'autofagia rappresentano una strategia efficace per contrastare le alterazioni muscolari a valle del deficit di COL6 [4,5,7-9]. Nel presente progetto abbiamo ottimizzato i diversi modelli di UCMD/BM [2,6,8-10], e abbiamo studiato l'efficacia del nutraceutico spermidina (Spd) nei topi COL6 KO e nelle cellule di pazienti UCMD e BM. I risultati, ottenuti tramite esperimenti con Spd a diverse concentrazioni e diverse durate di trattamento, dimostrano che la somministrazione di Spd ai topi COL6 KO, disciolta nell'acqua di bevaggio alla concentrazione di 30 mM per 100 giorni, è altamente efficace nell'indurre i flussi autofagici e mitofagici, portando al recupero della forza muscolare e delle alterazioni alle miofibre [11].

Nostri studi precedenti avevano dimostrato che le alterazioni identificate nel topo COL6 KO sono presenti anche nelle biopsie muscolari e nelle colture cellulari da muscolo di pazienti UCMD/BM. I risultati ottenuti nel presente progetto dimostrano la presenza di difetti del processo autofagico e delle sue vie di segnalazione anche nei fibroblasti cutanei di pazienti UCMD e BM, aprendo quindi la strada per l'uso di tale strumento non invasivo per indagare e monitorare approcci terapeutici.

Abbiamo inoltre validato l'uso di cellule da sangue periferico come ulteriore strumento non invasivo per monitorare l'efficacia di Spd nell'attivare l'autofagia. Infine, mediante studi di proteomica abbiamo identificato un set di biomarcatori differenzialmente espressi in vescicole extracellulari di colture muscolari di topi COL6 KO, e li abbiamo validati nei fibroblasti cutanei derivati da pazienti UCMD e BM.

Tali risultati sono rilevanti nel contesto della ricerca delle distrofie muscolari legate a COL6, in

quanto finora solo le biopsie muscolari e colture cellulari di muscolo erano state utilizzate per valutare la risposta di outcome specifici a trattamenti. I nostri dati sugli effetti di Spd (induzione di autofagia, recupero della forza con elevata tollerabilità e assenza di effetti collaterali nel modello animale) sostengono fortemente i benefici di Spd e nutraceutici correlati come opzione terapeutica nei pazienti. Nel complesso, i risultati ottenuti forniscono un solido razionale per l'applicazione di Spd come supplemento nutrizionale in futuri trial clinici.

Disease Name:

Ullrich Congenital Muscular Dystrophy; Bethlem Myopathy

Nome malattia:

Distrofia muscolare congenita di Ullrich; Miopatia di Bethlem

Project number:

GJC21144

Genetic muscular disease\Myopathies and cardiomyopathies

13. CHROMATIN DYSFUNCTION IN EMERY DREIFUSS MUSCULAR DYSTROPHY

Santarelli P.^[1], Lembo G.^[2], Ferrari F.^[2], Lanzuolo C.*^[1]

^[1]Istituto Nazionale Genetica Molecolare ~ Milan ~ Italy, ^[2]IFOM ~ Milan ~ Italy

Emery Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) is a rare genetic disease belonging to the class of laminopathies. It is caused by mutations in genes encoding for nuclear envelope and lamina components. Despite the variety of mutations, the EDMD phenotype always involves skeletal and/or cardiac muscles dysfunctions. Previous literature, including our own publications, showed that in EDMD, like in other laminopathies, the disruption of the nuclear lamina structure results in a cascade of molecular alterations involving: nuclear shape, chromatin 3D architecture, epigenetic and transcriptional regulation. The exact sequence of molecular events is still largely uncharacterized, thus hampering our ability to find effective treatments. In this context, the Muscular LMNA Interacting Protein (MLIP) is a protein with function largely unknown (Tdark) but connected to EDMD, with a likely association to nuclear lamina components and possibly involved in gene regulation.

We hypothesize that MLIP is a chromatin associated protein that regulates transcription and may be involved in the EDMD molecular aberrations encompassing altered lamina function.

In this project we propose 1) to dissect the functional role of MLIP in transcriptional regulation of muscle differentiation and 2) to uncover its role in EDMD muscular dystrophy. We will apply state of the art molecular biology techniques together with unpublished cutting-edge technologies developed in our laboratories to analyse the chromatin 3D structure and compartmentalization upon knockdown of MLIP.

Our results will clarify MLIP molecular function in physiological and pathological muscle differentiation. Our work will provide new insights in muscular regulatory pathways that may be targeted by tailored medical treatments aimed to delay or block EDMD progression.

Alterazioni della cromatina nella distrofia muscolare di Emery-Dreifuss

La distrofia muscolare di Emery Dreifuss (EDMD) è una malattia genetica rara che causa problemi di funzionalità ai muscoli cardiaci e scheletrici. Sono state descritte diverse mutazioni che possono causare la malattia, tutte riguardanti proteine coinvolte nella struttura o funzione della lamina nucleare. La lamina nucleare è una rete di proteine importante per controllare la struttura tridimensionale del DNA, a sua volta fondamentale nella regolazione della funzionalità del genoma, ossia come diverse porzioni del genoma sono accese o spente in diversi tessuti e tipi cellulari. Tuttavia, nonostante l'identificazione dei geni responsabili della distrofia di Emery Dreifuss è difficile creare una chiara connessione tra il genotipo (mutazioni specifiche sulla sequenza del DNA) e meccanismi molecolari alla base della comparsa dei fenotipi (sintomi della malattia). In altre parole, le molecole coinvolte nella cascata che va dall'alterazione della funzione della lamina ai fenotipi della malattia sono poco note. Inoltre, ad oggi, non siamo stati in grado di avere un quadro chiaro sulle alterazioni della cromatina a causa della mancanza di tecnologie adeguate per eseguire analisi in profondità. MLIP è un gene dalla funzione ignota ma, sulla base delle poche informazioni disponibili fino ad ora, potenzialmente coinvolto nella cascata innescata dall'alterazione della lamina. In questo progetto impiegheremo tecniche sperimentali avanzate, inclusi metodi che abbiamo sviluppato noi, per capire il ruolo di MLIP nella distrofia di Emery Dreifuss. Questo studio non solo migliorerà la nostra conoscenza di base della malattia, ma potrà portare all'identificazione di nuovi bersagli per terapie innovative.

Disease Name:

Emery-Dreifuss muscular dystrophy

Nome malattia:

Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss

Project number:

GJC21144

14. TOWARDS PRECISION MEDICINE WITH HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FOR DYSTROPHIN ASSOCIATED CARDIOMYOPATHY

Rovina D.^[1], Pioner J.M.^[2], D'Amario D.^[3], Rabino M.^[1], Canonico F.^[4], Manzoni M.^[5], Novelli V.^[5], Sacconi L.^[6], Ferrantini C.^[7], Crea F.^[8], Pompilio G.*^[1]

^[1]Unit of Vascular Biology and regenerative Medicine, Centro Cardiologico Monzino ~ Milano ~ Italy, ^[2]Department of Biology, University of Florence ~ Firenze ~ Italy, ^[3]Department of Translational Medicine, University of Eastern Piedmont ~ Novara ~ Italy, ^[4]Department of Cardiovascular and Respiratory Sciences, Catholic University of the Sacred Heart ~ Roma ~ Italy, ^[5]Unit of Immunology and Functional Genomics, Centro Cardiologico Monzino IRCCS ~ Milano ~ Italy, ^[6]European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy (LENS) ~ Firenze ~ Italy, ^[7]Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence ~ Firenze ~ Italy, ^[8]Department of Cardiovascular sciences, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS ~ Roma ~ Italy

The dystrophin-associated cardiomyopathy (DAC) is the leading cause of death in Duchenne and Muscular Dystrophy (DMD) patients with extremely divergent phenotypes. Discovering the mechanisms underlying DAC is an imperative unmet need and, to answer this, our study aims to:

-create a DMD patients' cardiovascular biorepository consisting of clinical data, biological samples and iPSCs;

-model the DAC in vitro using cardiomyocytes derived from patient specific iPSCs.

To create our biobank, we recruited 26 DMD patients, collected biological samples and clinical data and generated 9 iPSCs. In parallel, to study the underlying mechanisms of the variable DAC, we verified if patients, in addition to dystrophin mutations, carry alteration in other genes associated to cardiomyopathies. NGS results showed that the 60% of patients have a VUS in one or more of these genes. To model DAC, we used iPSC-derived cardiomyocytes (CMs). We verified that DMD CMs showed at 90 days reduced Ca transient (CaT) amplitude and faster CaT rise and RT50, compared to control CMs. Moreover, higher stiffness did not modify CaTs in DMD CMs, as observed in control, but led to higher SR Ca content. To better model DAC, we developed an engineered heart tissues (ETH) that was used to measure contractile force. Preliminary results showed that DMD-EHTs produced less contractile force compared to control-EHTs. Finally, to better characterize the cardiac electrophysiology, we develop an alternative optical approach, MULTIPLE, that combines optical detection of action potentials with optical stimulation, employing optogenetic actuators. The capability of MULTIPLE to detect action potential changes was demonstrated in HL-1 cells (mouse atrial myocyte-like cells) stably expressing the blue light-activatable cation channel CheRiff and employing the selective Kv11.1 channel blocker (E-4031) in a dose titration experiment.

In conclusion, our DMD biobank pave the way to a better study of the DAC by allowing the correlation of patient clinical data with the in vitro readouts.

TITOLO: Verso la medicina di precisione per la cardiomiopatia distrofica mediante l'utilizzo di cellule staminali pluripotenti indotte umane

Il coinvolgimento cardiaco risulta essere sempre più frequente nei pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne e Becker, due sindromi causate da mutazioni nel gene della distrofina. Le terapie esistenti hanno effetto per lo più sui sintomi e non agiscono sui meccanismi causativi della

cardiomiopatia associata alla distrofia, che ad oggi risulta essere la principale causa di morte in questi pazienti. Al momento, non sono ancora stati identificati genotipi o marcatori biologici che permettano di identificare e stratificare i pazienti che svilupperanno la cardiomiopatia. Il nostro gruppo ha dimostrato che le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), ottenute dalla riprogrammazione di cellule somatiche derivanti da pazienti, possono essere differenziate in cardiomiociti (le cellule del cuore) (iPS-CM) che mostrano un fenotipo patologico. Identificare i meccanismi che stanno alla base dello sviluppo e della variabilità della cardiomiopatia in pazienti affetti da distrofia muscolare risulta essere fondamentale e per questo il nostro progetto ha come obiettivi:

-la creazione di una biorepository cardiovascolare di pazienti con distrofia muscolare, ossia una collezione di dati clinici dei pazienti, materiale biologico (ad esempio sangue) e iPSC;

-lo studio in laboratorio della cardiomiopatia mediante il modello basato sui iPS-CM.

Per creare la biobanca, 26 pazienti affetti da distrofia muscolare sono stati reclutati e per ognuno sono stati raccolti i dati clinici, con particolare attenzione all'aspetto cardiaco, e i campioni biologici comprendenti il sangue e le cellule del sangue. Sono quindi stati selezionati 9 pazienti da cui sono state ottenute le iPSC mediante riprogrammazione delle cellule del sangue. Studi di laboratorio sui iPS-CM paziente specifiche hanno dimostrato che in tali cellule si hanno alterazioni del calcio intracellulare, uno ione che interviene in differenti processi cellulari quali la contrazione. In aggiunta, per meglio studiare tale cardiomiopatia, è stato sviluppato un sistema tridimensionale che ricrea in modo più accurato il cuore creando dei tessuti cardiaci ingegnerizzati. Infine, è stato sviluppato anche un nuovo strumento per studiare meglio in laboratorio l'elettrofisiologia dei cardiomiociti (ovvero le caratteristiche elettriche).

In conclusione, questa biorepository potrà essere utilizzata e sarà un utile strumento per i ricercatori che studiano la cardiomiopatia associata alla distrofia muscolare, permettendo di correlare i dati clinici dei pazienti con i risultati ottenuti in laboratorio utilizzando i iPS-CM. Inoltre, sarà possibile approfondire e determinare i meccanismi alla base dello sviluppo della cardiomiopatia, e possibilmente di scoprire marcatori che permettano di predire lo sviluppo della cardiomiopatia stessa nei pazienti affetti da distrofia muscolare.

Disease Name:

Muscular Dystrophies, cardiomyopathy

Nome malattia:

Distrofie muscolari, cardiomiopatie

Project number:

GUP19012

15. NEW PHARMACOLOGICAL TREATMENT FOR TUBULAR AGGREGATE MYOPATHIES

Pessolano E.*, Genazzani A.A.

University of Piemonte Orientale ~ Novara ~ Italy

Store-Operated Ca²⁺-Entry (SOCE) is a cellular mechanism that controls the replenishment of intracellular Ca²⁺ stores when depleted by opening intracellular Ca²⁺ channels. Gain-of-function mutations of the two key proteins of SOCE, STIM1 and ORAI1, are associated with several rare disorders clustered as tubular aggregate myopathies (TAM). Our group has shown that a mouse model bearing the STIM1 p.I115F mutation recapitulates the main features of these diseases:

thrombocytopenia and muscle weakness. Currently, there is no valid treatment for these patients. We started a drug discovery process to develop SOCE modulators, which discovered CIC-39Na as a specific, potent, and bioavailable compound.

In the present communication, we report the *in vivo* efficacy of CIC-39Na in restoring platelet number and reducing abnormal bleeding. Subtle differences in thrombopoiesis were observed in STIM1 p.I115F mice, but the main difference between wild-type and KI-STIM1I115F mice was in platelet clearance and in the levels of platelet cytosolic basal Ca²⁺. Both were restored upon treatment of animals with CIC-39Na.

Moreover, CIC-39Na reduces tubular aggregates in muscle, re-establishes functional motor capacity *in vivo* and restores SOCE to physiological levels in KI-STIM1I115F derived myotubes.

Finally, data obtained through proteomic and RNAseq analysis show activation of ER stress and mitochondria dysfunction in KI-STIM1I115F muscles. Our working hypothesis is that an increased Ca²⁺-entry through ORAI1 leads to a modest increase in cytosolic Ca²⁺ that may incorrectly modulate Ca²⁺-dependent processes, but more importantly, deranges Ca²⁺ homeostasis in the ER/SR and mitochondria, with the induction of ER stress and bioenergetic dysfunctions.

Nuovo trattamento farmacologico per Tubular Aggregate Myopathies

Store-Operated Ca²⁺-Entry (SOCE) è un meccanismo cellulare che controlla la ricostituzione delle riserve intracellulari di Ca²⁺ una volta esaurite. Le mutazioni con guadagno di funzione a carico delle due proteine chiave di SOCE, STIM1 e ORAI1, sono associate a diverse malattie rare raggruppate come Tubular aggregate myopathies (TAM). Il nostro gruppo ha dimostrato che un modello murino portante la mutazione STIM1 p.I115F presenta le caratteristiche principali di queste malattie: trombocitopenia e debolezza muscolare. Attualmente non esiste un trattamento valido per questi pazienti. Il nostro gruppo di ricerca ha avviato un processo di drug discovery per sviluppare modulatori SOCE, identificando CIC-39Na come composto selettivo, potente e biodisponibile.

In questa comunicazione, riportiamo l'efficacia *in vivo* di CIC-39Na che è risultato in grado di ripristinare il numero di piastrine e ridurre il sanguinamento anomalo. I topi STIM1 p.I115F manifestano rispetto ai topi wild-type differenze nella trombopoiesi, nella clearance piastrinica e nei livelli di Ca²⁺ citosolico piastrinico a livello basale. Queste caratteristiche dei topi STIM1 p.I115F sono state ripristinate in seguito al trattamento degli animali con CIC-39Na.

Il CIC-39Na, inoltre, riduce gli aggregati tubulari nei muscoli, ristabilisce la capacità motoria funzionale *in vivo* e ripristina SOCE a livelli fisiologici nei miotubi derivati da KI-STIM1I115F.

Infine, i dati ottenuti da analisi di proteomica e RNAseq mostrano un'attivazione dello stress del reticolo endoplasmatico e della disfunzione mitocondriale nei muscoli KI-STIM1I115F. Ipotizziamo, quindi, che un aumento dell'ingresso di Ca²⁺ attraverso ORAI1 porti a un modesto aumento del Ca²⁺ citosolico e ciò può modulare in modo errato i processi Ca²⁺-dipendenti, ma soprattutto, può alterare l'omeostasi del Ca²⁺ nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri, inducendo stress del reticolo e disfunzioni bioenergetiche.

Disease Name:

Tubular Aggregate Myopathy

Nome malattia:

Miopatia da aggregati tubulari

Project number:

GGP19110

16. ROLE OF STORE-OPERATED CA²⁺ ENTRY (SOCE) IN TUBULAR AGGREGATE MYOPATHY.

Protasi F.*^[1], Sorrentino V.^[2]

^[1]University G. d'Annunzio of Chieti-Pescara ~ Chieti ~ Italy, ^[2]University of Siena ~ Siena ~ Italy

Background and Rationale:

Altered store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) - a mechanism that allows recovery of extracellular Ca²⁺ during prolonged muscle activity via Ca²⁺ entry units (CEUs) (1) - causes debilitating disorders including Tubular Aggregate (TA) myopathy. TA myopathy (TAM) (2) is a rare disease linked to mutations in STIM1, Orai1, and CASQ1, and characterized by muscle pain, cramping, weakness, and presence of TAs. The mechanisms linking human mutations to SOCE dysfunction, dysregulation of Ca²⁺ homeostasis, and finally to development of TAM are still unknown.

Summary of Main Results collected:

SA1: Which mechanisms underlie assembly of additional CEUs during exercise? The mechanisms underlying the exercise-dependent remodeling of SR and TT leading to CEU assembly are unknown. Here, we first verified that CEUs can assemble ex-vivo (in absence of blood supply and innervation) and then found that higher temperature (36°C vs. 25°C) and lower pH (7.2 vs. 7.4) strongly promotes formation of CEUs.

SA2: Are sex hormones involved in the preferential accrual of Tubular Aggregates in male mice? TAs form spontaneously during sedentary ageing in fast twitch fibers of male mice (3). We first demonstrated that regular exercise (which activates SOCE) significantly reduces formation of TAs; then we verified that TAs formation is significantly reduced in muscles of mice treated with: i) 17β-estradiol (E2, at the final concentration of 440 ng / ml H₂O in the drinking water); or ii) N-acetylcysteine (NAC at the concentration of 1% w/v), which has anti-oxidant properties.

SA3: Do expression of the Orai1-G98S and CASQ1-D44N mutations in knock-in mice result in TAM? In collaboration with R. T. Dirksen (University of Rochester, NY), we have generated two knock-in mice expressing: i) Orai1-G98S, a gain-of-function mutation linked a severe form of TAM (4); ii) CASQ1-D44N, a loss-of-function mutation also linked to a form of TAM (5). The Orai1-G98S mutation resulted in muscle weakness, impaired SOCE and formation of TA both in male and females mice, which could be reduced by voluntary running. The CASQ1-D44N causes a mild (in males) and later onset (in females) phenotype, substantially different from that of G98S mice, i.e. structurally more similar to a vacuolar myopathy.

SA4: Which mechanisms are triggered by CASQ1 mutations in Tubular Aggregate Myopathy? To analyze the functional alteration of CASQ1 mutation on Ca²⁺ homeostasis, we expressed WT and 3 CASQ-1 mutant proteins (D44N, G103D, I385T) found in four patients with TAM in FDB muscle of CASQ1 knockout mice (6). Transfection of CASQ1WT increased the intracellular Ca²⁺ content while a significant lower increase was observed in fibres expressing mutant CASQ1. In addition, expression of mutant CASQ1 induced a constitutively higher active Ca²⁺ entry compared to CASQ1WT. More recently we identified causative mutations in RYR1 in patients with TAM, thus adding RYR1 to the list of TAM causative genes.

Titolo: Ruolo di SOCE nella Miopatia degli Aggregati Tubulari.

La funzione del muscolo è controllata dai livelli intracellulari di Calcio. L'ingresso di Calcio (Ca²⁺) controllato dalle riserve intracellulari (SOCE) è un meccanismo attivato durante l'attività prolungata che permette al muscolo di recuperare il Ca²⁺ esterno e limitare la fatica. Due sono le proteine principali implicate nella funzione di SOCE (STIM1 ed Orai1), il cui accoppiamento durante la fatica permette il recupero del Ca²⁺ extracellulare. Recentemente anche la proteina Calsequestrina-1

(CASQ1) è stata proposta come importante modulatore della funzione di SOCE.

Mutazioni in STIM1, Orai1 e CASQ1 (queste ultime identificate nei nostri laboratori) sono state trovate in pazienti affetti da Miopatia degli Aggregati Tubulari (TAM), una malattia del muscolo caratterizzata da insorgenza di crampi, debolezza muscolare e da presenza di aggregati tubulari, ordinati accumuli di tubuli che originano da rimodellamento del reticolo sarcoplasmatico, che è il sistema che immagazzina il Ca²⁺ all'interno delle fibre. I meccanismi che legano le mutazioni in STIM1, Orai1 e CASQ1 alla formazione degli aggregati tubulari e a disfunzione muscolare sono ancora sconosciuti.

Lo scopo principale del nostro progetto è quello di capire quali meccanismi legano la disfunzione di SOCE causata da mutazioni coinvolte all'alterazione dei meccanismi che regolano il Ca²⁺ intracellulare, e allo sviluppo della TAM. Per fare questo:

- a) stiamo studiando gli aggregati tubulari in topi maschi anziani, da laboratorio i quali sviluppano una forma benigna della malattia degli aggregati tubulari
- b) abbiamo anche sviluppato modelli animali di TAM esprimendo due mutazioni umane, una in Orai1 ed una CASQ1 (rispettivamente Orai1-G98S e CASQ1-D44N), mutazioni identificate in pazienti affetti dalla miopatia;
- c) stiamo esprimendo mutazioni di CASQ1 identificate in pazienti in modelli cellulari per comprendere le basi molecolari della disfunzione associata alla loro espressione.

I dati che stiamo collezionando nei nostri due laboratori, solo in parte già pubblicati, promettono di avanzare la comprensione dei meccanismi alla base dello sviluppo della miopatia TAM nell'uomo. I nostri risultati suggeriscono che la formazione degli aggregati tubulari è associata ad una condizione in cui la funzione di SOCE è depressa. Nei modelli animali, sia in topi anziani che in quelli portatori di mutazione nella proteina Orai1, siamo infatti riusciti a ridurre la formazione degli aggregati tubulari mantenendo SOCE attivo con l'esercizio fisico eseguito giornalmente dagli animali. Abbiamo osservato inoltre che gli aggregati sembrano formarsi maggiormente nelle fibre dei topi maschi e che gli estrogeni sembrano ridurre la loro formazione. Stiamo infine anche valutando l'azione di agenti antiossidanti somministrati nella dieta e nell'acqua e i risultati preliminari sembrano essere promettenti.

Disease Name:

Tubular Aggregate Myopathy

Nome malattia:

Miopatia da aggregati tubulari

Project number:

GGP19231

Genetic muscular disease\Myotonic disorders

17. GENE EDITING IN MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1: ASSESSMENT OF EFFICIENCY, SAFETY AND THERAPEUTIC EFFECT OF CTG-REPEAT DELETION IN A MOUSE MODEL OF DISEASE

Izzo M.*^[1], Battistini J.^[1], Cardinali B.^[1], Provenzano C.^[1], Mandillo S.^[1], Golini E.^[1], Strimpakos G.^[1], Scavizzi F.^[1], Raspa M.^[1], Voellenkle C.^[2], Perfetti A.^[2], Baci D.^[2], Martelli F.^[2], Lazarevic D.^[3], Garcia--Manteiga J.M.^[3], Gourdon G.^[4], Falcone G.^[1]

^[1]Institute of Biochemistry and Cell Biology, CNR ~ Monterotondo (RM) ~ Italy, ^[2]Gruppo Ospedaliero San Donato Foundation c/o Policlinico San Donato-IRCCS ~ San Donato Milanese, Milan ~ Italy, ^[3]IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[4]Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie ~ Paris ~ France

Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) is a dominantly inherited neuromuscular disease caused by the abnormal expansion of CTG-triplets in the 3' untranslated region of the DMPK gene and accumulation of the toxic mutated transcripts into ribonuclear foci, leading to a generalized alteration of gene expression. The recent advances in the CRISPR/Cas9 technology have been exploited to correct the genetic basis of diseases such as DM1. Cas9 endonuclease can be targeted to specific locations in the genome via an RNA-guided system to induce double-strand breaks in regions of interest and eliminate permanently the pathogenetic mutation. To achieve this goal, we have generated and transduced tissue-specific and inducible CRISPR/Cas9 components in myogenic cells derived from patients affected by DM1 and obtained the removal of the pathogenetic CTG-repeat expansion and the phenotypic reversion of edited cells. The occurrence of off-target and on-target unintended editing was carefully evaluated. The Cas9 and RNA guides previously tested in DM1 patient-derived cells were then inserted in the backbone of Adeno-Associated Vectors (AAVs) for in vivo administration. Local and systemic transduction of the CRISPR/Cas9 molecules in DMSXL mice, a DM1 mouse model carrying a mutated human transgene from a DM1 patient, resulted in CTG-repeat deletions in the skeletal muscles and in the heart. Although editing efficiency was variable among individuals, partial reversal of DM1-associated molecular alterations in edited tissues was obtained. We have recently optimized editing efficiency by using AAVs showing enhanced tropism for skeletal muscles. Systemic transduction by these myotropic AAVs resulted in much higher expression of CRISPR/Cas9 components in muscles and reduction of ribonuclear foci in the heart of all treated animals. Importantly, recovery of molecular alterations was paralleled by a significant improvement of body weight, that is much reduced in DMSXL mice.

Differently from the available therapeutic approaches, CRISPR/Cas9-mediated gene editing is a flexible and efficient technology for durable treatment of DM1 and a detailed understanding of its therapeutic potential in preclinical models is crucial for future application in DM1 patients.

CORREZIONE DELLA MUTAZIONE GENICA DELLA DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA, DELLA SICUREZZA E DELL'EFFETTO TERAPEUTICO DELL'"EDITING" GENETICO IN UN MODELLO MURINO DELLA MALATTIA

La distrofia miotonica di tipo 1 (DM1) è una malattia neuromuscolare ereditaria dominante causata dall'espansione anormale di una sequenza ripetuta di DNA (CTG) del gene DMPK e dall'accumulo di RNA messaggero prodotto dal gene mutato in aggregati nucleari detti foci che portano ad un'alterazione generalizzata dell'espressione genica. I recenti progressi nella tecnologia CRISPR/Cas9 sono stati sfruttati per correggere le basi genetiche di malattie come la DM1. La proteina Cas9 può essere veicolata in regioni specifiche del genoma tramite un sistema guidato da molecole di RNA in modo da indurre dei tagli nelle regioni di DNA designate ed eliminare definitivamente la mutazione patogenetica, producendo un evento di "editing" genetico. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo generato i componenti del complesso CRISPR/Cas9

specifici per il tessuto muscolare e li abbiamo trasferiti in cellule derivate da pazienti affetti da DM1 ottenendo la rimozione della sequenza ripetuta di CTG e la parziale correzione dei difetti delle cellule modificate. L'eventuale verificarsi di eventi di taglio del DNA in regioni non previste e la precisione delle correzioni ottenute nelle regioni desiderate è stato attentamente valutato. Le stesse componenti del complesso CRISPR/Cas9 precedentemente testate in cellule derivate da pazienti affetti da DM1 sono state quindi inserite in vettori virali adeno-associati (AAV) per la somministrazione in modelli animali. I topi DMSXL sono un modello di DM1 che contiene il gene umano DMPK mutato ottenuto da un paziente di DM1. Il trasferimento locale e sistemico delle molecole del complesso CRISPR/Cas9 nei topi DMSXL ha prodotto la rimozione prevista delle espansioni di CTG nei muscoli scheletrici e nel cuore. Sebbene l'efficacia della correzione fosse variabile, è stata ottenuta una parziale "normalizzazione" delle alterazioni molecolari associate alla DM1 nei tessuti corretti. Recentemente abbiamo ottimizzato l'efficienza dell'editing utilizzando vettori AAV che mostrano un tropismo accentuato per i muscoli scheletrici. Questi AAV hanno indotto un'espressione molto più elevata dei componenti del complesso CRISPR/Cas9 nei muscoli, e una significativa riduzione dei foci nucleari nel cuore di tutti gli animali trattati. Inoltre, il recupero delle alterazioni molecolari è stato accompagnato da un significativo miglioramento del peso corporeo, che è molto ridotto nei topi DMSXL.

Diversamente dagli approcci terapeutici finora disponibili, l'editing genetico mediato da CRISPR/Cas9 è una tecnologia flessibile ed efficace per un trattamento duraturo della DM1 e lo studio approfondito del suo potenziale terapeutico nei modelli preclinici è cruciale per una futura applicazione nei pazienti affetti da DM1.

1. Izzo M, Battistini J, Provenzano C, Martelli F, Cardinali B, Falcone G. (2022) "Molecular Therapies for Myotonic Dystrophy Type 1: From Small Drugs to Gene Editing". *Int J Mol Sci.* 2022, 23, 4622. Doi: 10.3390/ijms23094622. Review.

2. Cardinali B, Provenzano C, Izzo M, Voellenkle C, Battistini J, Strimpakos G, Golini E, Mandillo S, Scavizzi F, Raspa M, Perfetti A, Baci D, Lazarevic D, Garcia-Manteiga JM, Gourdon G, Martelli F, Falcone G. (2021) "Time-controlled and muscle-specific CRISPR/Cas9-mediated deletion of CTG-repeat expansion in the DMPK gene". *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021 Nov 29;27:184-199. doi: 10.1016/j.omtn.2021.11.024. eCollection 2022 Mar 8. PMID: 34976437

Disease Name:

Myotonic Dystrophy type 1

Nome malattia:

Distrofia Miotonica di tipo 1

Project number:

GGP19035

18. TRIAL READINESS AND ENDPOINT ASSESSMENT IN CONGENITAL AND CHILDHOOD MYOTONIC DYSTROPHY: OUTCOME MEASURES AND ENDPOINT ASSESSMENTS

Albamonte E.^[1], Trucco F.^[2], Di Bari A.^[1], Salmin F.^[1], Fiorillo C.^[6], D'Amico A.^[4], Ricci F.^[5], Pini A.^[8], Astrea G.^[9], Moroni I.^[7], Berardinelli A.^[3], Mercuri E.^[10], Sansone V.*^[2]

^[1]Centro Clinico Nemo, Fondazione Serena, Milano ~ Milano ~ Italy, ^[2]Dipartimento Neuroriabilitazione Università di Milano ~ Milano ~ Italy, ^[3]Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino ~ Pavia ~ Italy, ^[4]Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - IRCCS ~ Roma ~ Italy, ^[5]Dipartimento di Scienze Pediatriche - Ospedale Infantile Regina Margherita ~ Torino ~ Italy, ^[6]Università di Genova - Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[7]Fondazione IRCCS

Istituto Neurologico Carlo Besta ~ Milano ~ Italy, ^[8]Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna - IRCCS ~ Bologna ~ Italy, ^[9]Fondazione IRCCS Stella Maris ~ Pisa ~ Italy, ^[10]Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli - IRCCS Università Cattolica del Sacro Cuore ~ Roma ~ Italy

Background and aims. The design of therapeutic trials in children with congenital (CDM) or childhood-onset myotonic dystrophy type 1 (ChDM) has been significantly limited by the lack of long-term, appropriate clinical endpoints and disease biomarkers due to the heterogeneous and often extramuscular clinical phenotype. This is particularly challenging in children, when severe behavioral issues are also prominent.

The aim of this project is to coordinate nine Italian Centres with expertise in the diagnosis and management of CDM and ChDM in a joint effort to create disease-specific standardized protocols and procedures. Specific aims are to prospectively collect functional measures to define clinically meaningful endpoints in preparation for international therapeutic clinical trials.

Methods. Three-year, multicenter observational longitudinal study involving paediatric patients (age <18years) with expanded trinucleotide (CTG) repeat (i.e. above 200) in the DMPK gene and enrolled in two parallel arms. One arm includes at least 30 patients with CDM (onset within 30 days of life), the second 20 patients with ChDM (onset after the 1st month of life).

The study involves assessments at baseline and every 6 months. At each visit anthropometric and genetic data, motor and respiratory function (10 meters walk, 6 minute walk test, grip and pinch strength, 4 star climb, FVC via spirometry), myotonia testing, muscle mass and bone assessment via DXA, speech and feeding measures (lip and tongue strength via Iowa Oral Performance Instrument, Test of Mastication and Swallowing Solid, TOMASS), Quality of life and cognitive measures are gathered.

Results. As of 15.12.2022, 60 patients (45 CDM, 15 ChDM) were included across the nine centres. Median [IQR] age at baseline was 12.7 [9.3-16.0] years for ChDM and 12.0 [9.1-15.7] years for CDM.

CTG expansion was available in 41 of 60 patients. Of the 12 ChDM 7 were classified as E1 (CTG<500), 4 E2 (CTG 500-1000), 1 E3 (CTG 1000-1500), whilst of the 29 CDM 1 was E1, 12 E2, 15 E3, 1 E4 (CTG>1500).

Regarding motor function, 6MWT was feasible in 20/33 CDM patients, the median distance being 442[389.5-505.8]m; all ChDM were ambulant and walked for a median distance of 486[416.6-526.3]m. Pinch and grip strength were feasible in half of the patients due to either distal hypotonia or lack of cooperation.

Similarly, a minority of patients was able to complete assessments of oro-pharyngeal abilities. The data available showed that in both CDM and ChDM swallowing and time to eat were impaired.

Finally, overall the median FVC% was mildly reduced in both CDM (n=14) being 67.5%[51.3-83.5] and ChDM (n=10) being 73%[58-88].

Conclusions. This project supported by Telethon is in its final year and data is being analysed. By providing a thorough definition of the natural history of the multisystemic aspects of the disease, it will pave the way to the design of clinical trials for paediatric myotonic dystrophy (CDM and ChDM).

Razionale e obiettivi dello studio. La condotta di studi clinici nei bambini con distrofia miotonica di tipo 1 congenita (CDM) o ad esordio infantile (ChDM) è limitata dalla mancanza di misure cliniche appropriate per descrivere la progressione della patologia. Questo è principalmente dovuto al fenotipo clinico con sintomi spesso extramuscolari, e al grave coinvolgimento cognitivo-comportamentale tipico delle forme infantili.

Lo scopo di questo progetto è coordinare nove centri italiani con esperienza nella diagnosi e gestione di CDM e ChDM nella creazione di protocolli e procedure standardizzati specifici per la malattia. Obiettivi specifici sono la raccolta prospettica di misure funzionali per definire endpoint clinicamente significativi in preparazione alle prossime sperimentazioni cliniche terapeutiche

internazionali.

Metodi. Studio longitudinale osservazionale multicentrico della durata di tre anni che ha coinvolto pazienti pediatrici (età < 18 anni) con espansione patologica del trinucleotide CTG (sopra le 200 copie) nel gene DMPK. I pazienti sono arruolati in due bracci, in uno sono inclusi almeno 30 pazienti con CDM (esordio entro 30 giorni di vita), il secondo 20 pazienti con ChDM (esordio dopo il 1° mese di vita).

Ad ogni visita (arruolamento e ogni 6 mesi) vengono raccolti dati antropometrici e genetici, funzione motoria e respiratoria (test di cammino dei 6 minuti, 6MWT, forza di chiusura del pugno e delle dita, Capacità Vitale Forzata tramite spirometria), test della miotonia della mano (tempo di rilassamento dopo chiusura forzata), valutazione della massa muscolare e ossea tramite DXA, valutazione dell'intelligibilità dell'eloquio e misure di funzione oro-bulbare (forza delle labbra e della lingua tramite Iowa Oral Performance Instrument, Test di masticazione e deglutizione dei solidi, TOMASS), qualità della vita e misure cognitive.

Risultati. Al 15.12.2022, sono stati arruolati 60 pazienti (45 CDM, 15 ChDM). L'età mediana [IQR] al basale era di 12,7 anni per ChDM e di 12,0 anni per CDM. L'espansione del CTG era disponibile in 41 pazienti su 60.

Per quanto riguarda la funzione motoria, il 6MWT era fattibile in 20/33 pazienti CDM, la distanza mediana era di 442 m; tutti i ChDM erano deambulanti e camminavano per una distanza media di 486 m. La forza delle dita e della mano è stata valutabile in metà dei pazienti a causa dell'ipotonìa distale o della mancanza di cooperazione.

Una minoranza di pazienti è stata in grado di completare le valutazioni delle capacità oro-faringee. In questi pazienti la deglutizione e il tempo per mangiare erano compromessi.

Infine, la FVC% mediana era ridotta sia nel CDM (n=14) pari al 67,5% sia nel ChDM (n=10) pari al 73%.

Conclusioni. Questo progetto sostenuto da Telethon è attualmente nell'ultimo anno di reclutamento e analisi dei dati. La definizione completa degli aspetti multisistemici della malattia, aprirà la strada alla progettazione di studi clinici per la distrofia miotonica pediatrica.

Disease Name:

Myotonic Dystrophy type 1

Nome malattia:

Distrofia miotonica di tipo 1

Project number:

GUP19002

19. ROLE OF POLYAMINES-EIF5A-AUTOPHAGY AXIS IN THE PATHOGENESIS OF MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 2

Bordone R., Coni S., Marzullo M., D'Amico R., Ciapponi L., Canettieri G.*

Università di Roma La Sapienza ~ Roma ~ Italy

Type 2 Myotonic Dystrophy (DM2) is a genetic multi-systemic disease, primarily affecting skeletal muscle. It is caused by the expansion of the quadruplets CCTGn in the intron 1 of the CNBP/ZNF9 gene. Haploinsufficiency of the CNBP gene is believed to play a role in the pathogenesis of DM2.

We recently demonstrated that CNBP deficiency in a *Drosophila* model causes locomotor defects, which are linked to a significant decrease of ODC translation, the first-rate limiting enzyme in polyamine production and to a strong reduction of polyamine intracellular level. Then polyamine metabolism is impaired in this animal model, and it is also altered in human DM2 muscle tissues. However, the exact mechanism linking the impairment of CNBP/ODC/polyamine axis to the observed locomotor dysfunction is currently unknown. Since the translation factor eIF5A is a critical mediator of polyamine-mediated autophagy, here we propose that the decrease of the CNBP-ODC-Polyamine axis observed in DM2 models may cause an impairment of muscle function by inhibiting eIF5A-mediated translation of key targets involved in autophagy. This is a new and completely unexplored issue for this disease. Results of our work might have a relevant translational impact that may soon lead to novel therapeutic strategies for DM2, a disease that still lacks a resolutive treatment.

Ruolo dell'asse Poliammine-EIF5A-Autofagia della patogenesi della distrofia miotonica di tipo 2

La Distrofia Miotonica 2 (DM2) è una malattia genetica che colpisce il muscolo scheletrico ed altri organi, causata da una mutazione del gene CNBP/ZNF9. Ad oggi i meccanismi molecolari alla base del DM2 non sono stati compresi e attualmente manca una terapia risolutiva. In uno studio precedente abbiamo scoperto che la riduzione del prodotto del gene CNBP/ZNF9 nel muscolo influisce sulla funzione locomotoria provocando una diminuzione delle poliammine, piccole molecole fondamentali per la sopravvivenza delle cellule muscolari. In questa proposta miriamo a chiarire se la riduzione di poliammine causi una compromissione della funzione muscolare influenzando l'autofagia, un processo che protegge le cellule muscolari quando i nutrienti sono bassi o non disponibili. I risultati di questo lavoro potrebbero aprire la porta a nuove strategie terapeutiche per una malattia che non ha ancora una cura.

Disease Name:

Myotonic Dystrophy type 2

Nome malattia:

Distrofia Miotonica di tipo 2

Project number:

GMR22T1027

Genetic neurological disorder\Neuromuscular diseases

20. MITOCHONDRIAL MYOPATHY ASSOCIATED TO FDX2 MUTATIONS: A CROSSROADS OF FES PROTEIN BIOGENESIS AND COENZYME Q BIOSYNTHESISCostantini P.*^[1], Ciofi--Baffoni S.^[2], Doni D.^[1], Grifagni D.^[2]^[1]Department of Biology, University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]CERM, University of Florence ~ Florence ~ Italy

Episodic mitochondrial myopathy with or without optic atrophy and reversible leukoencephalopathy (MEOAL, OMIM number: 251900) is an autosomal recessive neuromuscular disorder characterized by childhood onset of progressive muscle weakness and exercise intolerance. It is caused by the mutation of the FDX2 gene, encoding the mitochondrial protein ferredoxin-2 [1]. Two different mutation has been described to date: 1) c.1A > T, affecting the start codon of FDX2, resulting in a severe reduction of the FDX2 protein and causing recurrent myoglobinuria, lactic acidosis and slowly progressive muscle weakness [1, 2]; 2) c.431C > T (p.P144L), associated to a complex neurological phenotype involving early onset optic atrophy followed in the first or second decade of life by progressive myopathy, recurrent episodes of cramps, myalgia, muscle weakness and axonal polyneuropathy [3]. Therefore, different mutations of the same gene lead either to a relatively mild skeletal muscle phenotype or to a complex multisystem neurological/neuromuscular syndrome. The FDX2 protein is central for ATP production by mitochondria. However, to date there are important gaps in the understanding the role of this protein in mitochondrial pathophysiology and in the impact of the mutations found in MEOAL patients. These are the basis of the broad objectives of the proposal recently granted by Telethon and Cariplo Foundations: i) define how FDX2 participates in the assembly of FeS clusters, redox cofactors of the respiratory chain, and how the pathogenic mutations impair this function of FDX2, ii) establish whether FDX2 is involved in the biosynthesis of Coenzyme Q (CoQ), a molecule working, like FeS clusters, in the electron transport chain. Our main hypothesis is that FDX2 works at the crossroads of these two metabolic pathways and, therefore, that defects of both are responsible for the mitochondrial dysfunctions of MEOAL patients. We will address this hypothesis by a multidisciplinary approach ranging from studies on purified proteins to analyses of these pathways in cellular models of MEOAL disease. Specifically, we will i) investigate in vitro, with a set of spectroscopic techniques, the molecular basis of [4Fe-4S] cluster assembly and the structural/functional interactions between FDX2 and COQ6, a monooxygenase working, in yeast, in the CoQ biosynthesis pathway along with FDX2; ii) address the impact of the pathogenic mutations on these processes; iii) explore in MEOAL cellular models, obtained by CRISPR-Cas9 technology, the FeS clusters/CoQ biosynthesis and the mitochondrial phenotype by advanced imaging, biochemical and mitochondrial physiology analyses. We expect to gain new insights in the molecular mechanisms driving the FeS/CoQ biosynthesis in healthy cells and into the upstream events leading to the overall decrease of bioenergetics efficiency afflicting MEOAL patients' cells.

Miopatia mitocondriale associata a mutazioni di FDX2: crocevia tra biogenesi di proteine FeS e biosintesi di Coenzima Q

La miopatia mitocondriale episodica con o senza atrofia ottica e leucoencefalopatia reversibile (MEOAL) è un disordine neuromuscolare ereditario raro, ad esordio infantile, caratterizzato clinicamente da debolezza muscolare progressiva e intolleranza all'esercizio. Ulteriori e più variabili caratteristiche della malattia possono includere atrofia ottica, leucoencefalopatia reversibile o parzialmente reversibile e polineuropatia sensitivo-motoria ad insorgenza più tardiva. Questa malattia è emersa di recente: è stata identificata per la prima volta nel 2014 in una ragazza di 15 anni e fino ad ora sono state trovate due mutazioni patogeniche in otto individui. MEOAL è causata da mutazioni di ferredossina-2 (FDX2), una proteina che sembra avere un ruolo

essenziale nella produzione di energia da parte dei mitocondri, le “centrali elettriche delle cellule”. FDX2 è stata infatti proposta partecipare alla formazione dei centri ferro-zolfo, cofattori essenziali per una corretta funzionalità mitocondriale, e alcune indicazioni sperimentali suggeriscono che potrebbe essere coinvolta anche nella biosintesi del Coenzima Q, una molecola che svolge un ruolo chiave in numerosi processi biologici, malattie umane e protocolli terapeutici. Tuttavia, ad oggi rimangono diverse lacune nella comprensione completa del ruolo di FDX2 nella fisiopatologia mitocondriale e attualmente non esiste una cura specifica o un trattamento efficace per i pazienti affetti da MEOAL. L’obiettivo del nostro progetto è quindi quello di chiarire come FDX2 funziona nelle cellule sane e in che modo le mutazioni patogeniche note influenzano la sua attività. La definizione delle caratteristiche molecolari della malattia è un compito irrinunciabile per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate alla cura della miopatia mitocondriale MEOAL.

Disease Name:

MEOAL

Nome malattia:

Miopatia mitocondriale episodica con o senza atrofia ottica e leucoencefalopatia reversibile (MEOAL)

Project number:

GJC21056

21. APPLICATION OF THE ESCHERICHIA COLI MODEL SYSTEM TO STUDY THE HUMAN POLYRIBONUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE

Falchi F.A.*, Pizzoccheri R., Alloni A., Forti F., Pavese G., Briani F.

Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy

Polyribonucleotide phosphorylase (PNPase) is a trimeric phosphorolytic RNA exonuclease highly conserved from bacteria to human. In humans, PNPase (hPNPase) is located in mitochondria and is implicated in RNA import from cytoplasm, mitochondrial RNA degradation and R-loops processing. Mutations in hPNPase-encoding gene cause diverse diseases ranging from hereditary hearing loss to multisystem oxidative phosphorylation deficiency disorders. Correlation of specific mutations to the protein molecular defects and the clinical symptoms is not an easy task due to the plethora of processes involving hPNPase and the small number of patients and their heterogeneous genetic backgrounds.

In this work we addressed hPNPase sequence-function correlation in vitro and in a bacterial model generated by expressing in *E. coli* hPNPase and the disease-linked variants P140L, Q387R, E475G and M745T. Preliminary in vitro data showed that hPNPase binds and degrades ssDNA like its bacterial orthologue. All mutants but M745T had reduced RNA and ssDNA binding, whereas only the Q387R displayed reduced RNA degradation activity. In the *E. coli* model, hPNPase caused R-loop accumulation and the worsening of phenotypic traits typical of the *E. coli* Δ npn strain lacking the orthologous EcPNPase. Hundreds of *E. coli* RNAs were stabilized in presence of hPNPase, with only few transcripts destabilized, suggesting that in *E. coli*, hPNPase may bind but not degrade the RNA. Strains expressing mutant hPNPases were phenotypically more similar to the Δ npn mutant than to the hPNPase-expressing strain, in agreement with their decreased RNA binding activity observed in vitro. Moreover, R-loop level was reduced in the Q387R and E475G mutants. We are currently testing in a bacterial two-hybrid system whether the mutations interfere with the interaction between hPNPase monomers.

UTILIZZO DEL SISTEMA MODELLO ESCHERICHIA COLI PER LO STUDIO DELLA POLIRIBONUCLEOTIDE FOSFORILASI UMANA

La poliribonucleotide fosforilasi (PNPasi) è un enzima trimerico ad attività esoribonucleasica e fosforolitica ed è altamente conservato dai batteri fino all'uomo. Negli esseri umani, la PNPasi (hPNPasi) si trova nei mitocondri ed è implicata nel trasporto degli RNA dal citoplasma, nella degradazione dell'RNA mitocondriale e nel processamento degli R-loop. Le mutazioni nel gene che codifica per la hPNPasi causano diverse malattie, tra cui sordità ereditaria e disturbi multisistemici dovuti a difetti nella fosforilazione ossidativa. Correlare le specifiche mutazioni ai difetti molecolari della proteina e ai sintomi clinici non è facile a causa della moltitudine di processi in cui la hPNPasi è coinvolta, del ridotto numero di pazienti e del loro eterogeneo assetto genetico.

Lo scopo di questo lavoro consiste nel correlare, laddove possibile, il difetto molecolare della PNPasi provocato dalle varie mutazioni con la severità delle condizioni patologiche che si determinano nei pazienti. Per questo, abbiamo utilizzato un modello batterico di *E. coli* che esprime la hPNPasi e le sue varianti patologiche P140L, Q387R, E475G e M745T. Dati preliminari ottenuti in vitro hanno dimostrato che la hPNPasi lega e degrada il DNA a singolo filamento così come il suo ortologo batterico. Tutte le hPNPasi mutanti tranne M745T mostrano una ridotta capacità di legame all'RNA e al DNA a singolo filamento, mentre solo Q387R mostra una ridotta attività di degradazione dell'RNA. In *E. coli*, l'espressione della hPNPasi causa l'accumulo di R-loop e il peggioramento di fenotipi caratteristici del ceppo di *E. coli* decto del gene endogeno (Δ pnp). Centinaia di RNA di *E. coli* risultano stabilizzati in presenza della hPNPasi e solo pochi trascritti destabilizzati, suggerendo che la hPNPasi possa legare ma non degradare l'RNA in *E. coli*. I ceppi che esprimono le hPNPasi mutate sono fenotipicamente più simili al mutante Δ pnp che al ceppo che esprime la hPNPasi, in accordo con la loro ridotta attività di legame dell'RNA osservata in vitro. Inoltre, il livello di R-loop è ridotto nei mutanti Q387R ed E475G. Attualmente stiamo anche testando se le mutazioni possano interferire con la trimerizzazione della hPNPasi tramite un sistema batterico a doppio ibrido.

Disease Name:

Mitochondrial Diseases; Hereditary hearing loss; Leigh Syndrome

Nome malattia:

Malattie mitocondriali; Sordità ereditaria; Sindrome di Leigh

Project number:

GGP20001

22. DEORPHANIZING AND FUNCTIONALIZING THE MITOCHONDRIAL PROTEIN TMEM65

Vetralla M.^[1], Santalla M.^[2], Sonda S.^[1], Pendin D.^[2], De Stefani D.^{*[1]}

^[1]Department of Biomedical Sciences ~ Padova ~ Italy, ^[2]Neuroscience Institute, CNR ~ Padova ~ Italy

Few years ago, a homozygous loss-of-function mutation in the TMEM65 gene was identified in a patient with a complex early-onset encephalomyopathic syndrome. For the only case report, clinical manifestations include severe brain atrophy, refractory seizures, lower extremity spasticity, dystonic posturing of the arms, and intermittently high lactates. Overall, the clinical phenotype resembles a mitochondrial encephalomyopathy, although in the absence of cardiac abnormalities (Nazli et al., 2017). Unfortunately, how this genetic defect leads to the pathology is currently a mystery. Indeed, few and contradictory information is available on the gene product, a 25kDa

protein with controversial subcellular localization and unexplained molecular function (Nishimura et al., 2014; Sharma et al., 2015). To solve this puzzle, we designed a complementary cross-species approach to explore molecular processes underlying neuromuscular disease linked to TMEM65 deficiency. We have now obtained compelling data indicating that TMEM65 controls ion homeostasis across the inner mitochondrial membrane. In parallel, we generated a new disease model based on *Drosophila melanogaster* that recapitulates some of the pathological hallmarks observed in patient carrying the homozygous deletion of the TMEM65 gene. Thanks to these breakthrough results, we can now frame a novel and reasonable hypothesis on disease pathogenesis, where overload of cations in mitochondria triggers organelle dysfunction and eventually cell death in high energy demanding tissues, thus accounting for the clinical phenotype. Importantly, this also paves the way to the design of novel strategies to correct, bypass or circumvent the genetic defect, thus preventing degenerative processes triggered by TMEM65 deficiency. Overall, our project not only assigned a clear molecular function to an orphan protein but may also represent the cornerstone for future interventions with potential impact for the affected patients.

Pochi anni fa, è stato riportato il caso di un paziente affetto da anomalie dei muscoli e del cervello causate da una mutazione genetica che porta alla perdita della proteina TMEM65. Sfortunatamente, si sa davvero poco della funzione di questa proteina. Alcuni lavori sostengono che sia localizzata nei mitocondri, le centrali energetiche di tutte le nostre cellule. Altri che sia un componente delle giunzioni che tengono insieme le cellule cardiache. Altri ancora hanno suggerito che funzioni come fattore di trascrizione o come chinasi/fosfatasi. Questi dati contrastanti indicano quindi che TMEM65 sia da considerarsi una proteina “orfana”, cioè priva di un ruolo biologico ben definito.

Ci siamo quindi impegnati per ideare un progetto in grado di chiarire queste controversie e capire quale sia il vero ruolo di TMEM65 nelle nostre cellule, in modo quindi da comprendere i meccanismi alla base della malattia causata dalla mancanza di TMEM65. Abbiamo già ottenuto alcuni risultati molto interessanti. Siamo riusciti infatti a dimostrare che TMEM65 funziona come un trasportatore di ioni dentro e fuori i mitocondri, regolando così la produzione di energia. Abbiamo anche generato un animale modello basato sul moscerino della frutta, che sarà utile per simulare la malattia umana. Tuttavia, l'aspetto più importante è che la comprensione della funzione di TMEM65 ci permette ora di capire non solo i meccanismi che stanno alla base della malattia, ma anche di pensare a potenziali strategie per correggere o aggirare il problema che colpisce i pazienti.

Disease Name:

Mitochondrial encephalomyopathy

Nome malattia:

Encefalomiopatia

Project number:

GJC21054

23. NOVEL STRATEGIES TO BLOCK TOXICITY OF THE MUTANT ANDROGEN RECEPTOR IN SPINAL AND BULBAR MUSCULAR ATROPHY (SBMA)

Galbiati M.*^[1], Cristofani R.^[1], Chierichetti M.^[1], Rusmini P.^[1], Crippa V.^[1], Tedesco B.^[1], Ferrari V.^[1], Casarotto E.^[1], Cozzi M.^[1], Pramaggiore P.^[1], Piccolella M.^[1], Boido M.^[2], Vercelli A.^[2], Cescon M.^[3], Bonaldo P.^[3], Pennuto M.^[4], Poletti A.^[1]

^[1]Dipartimento di scienze farmacologiche e biomolecolari "Rodolfo Paoletti", Università degli studi di Milano ~ Milano ~ Italy, ^[2]Department of Neuroscience "Rita Levi Montalcini," Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, University of Turin ~ Orbassano (TO) ~ Italy, ^[3]Department of Molecular Medicine, University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[4]Department of Biomedical Sciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a neuromuscular disease affecting lower motor neurons (MNs) and skeletal muscle caused by polyglutamine expansions in the androgen receptor (AR). Androgens trigger AR functions allowing its release from accessory chaperones, conformational changes and post-translational modifications (PTMs, mainly phosphorylation) necessary for AR mediated transcription. On ARpolyQ, androgens also trigger neurotoxic events harmful to nuclei, via ARpolyQ PTMs alterations, misfolding, aggregation, causing autophagy flux blockage. ARpolyQ PTMs are relevant, since AKT-mediated ARpolyQ phosphorylation enhances ARpolyQ degradation, ameliorating the SBMA mice phenotype. We reduced nuclear ARpolyQ toxicity by enhancing its cytoplasmic autophagy clearance with a combination of bicalutamide (which slows down AR nuclear translocation) and trehalose (an autophagy inducer). In SBMA mice both compounds improved motor behaviour and extended survival, with decreased ARpolyQ accumulation, reduced apoptosis and partially recovered muscle morphology. We are currently testing approaches aimed to "repair" mutant ARpolyQ, via translational synthesis of the shorter AR-A isoform lacking the toxic polyQ tract. Contrary to what has been described for ARpolyQ, we found that AR-A is soluble and less prone to form aggregates and insoluble species. As well as WT AR and ARpolyQ, AR-A is activated by androgens and phosphorylated by AKT. Moreover, AR-A is transcriptionally active. Endogenous AR-A is present in skeletal muscle, brainstem and spinal cord of SBMA mice. We demonstrated that the expression of AR-A and ARpolyQ together significantly reduces the aggregated and insoluble species of ARpolyQ. Expression of AR-A in fly models of SBMA prevents androgen-dependent neurodegeneration. Alternative AR mRNA translation will be driven by an AUG few nucleotides downstream to the CAG repeat testing specific nucleic acids (ASO, PMO, LNA, etc.) or FDA-approved drugs and natural compounds, that then will be tested in SBMA iPSCs-MNs or skeletal myofibers and SBMA flies. The re-routing of AR translational start may provide a potential better treatment for SBMA patients.

NUOVE STRATEGIE PER RIDURRE LA TOSSICITA' DEL RECETTORE DEGLI ANDROGENI MUTATO NELL'ATROFIA MUSCOLARE SPINALE E BULBARE (SBMA)

L'atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA) è una malattia neuromuscolare che colpisce i motoneuroni inferiori (MN) e il muscolo scheletrico. La malattia è causata da un allungamento di un tratto di aminoacidi ripetuti (la glutammina) nel recettore degli androgeni (AR) che normalmente serve a far sviluppare e mantenere le funzioni maschili negli uomini. L'AR mutato (ARpolyQ) mantiene la sua funzione nei pazienti, ma a causa della mutazione acquisisce una funzione tossica nei motoneuroni e nelle cellule muscolari. Gli androgeni normalmente attivano le funzioni AR consentendo l'espletamento delle sue funzioni, ma innescano anche gli eventi neurotossici dannosi (tra questi: alterazioni di modificazioni posttraduzionali, conformazioni alterate, aggregazione del recettore) che causano il blocco della sua degradazione tramite un sistema chiamato autofagia. In cellule, siamo riusciti a ridurre la tossicità dell'ARpolyQ a livello del nucleo cellulare, migliorando la sua degradazione via autofagia, utilizzando una combinazione di farmaci: la bicalutamide (che rallenta la traslocazione nucleare dell'AR) e il trealosio (un induttore dell'autofagia). In modelli animali che riproducono la patologia dell'uomo, entrambi i composti hanno migliorato il comportamento motorio ed esteso la sopravvivenza, portando ad una riduzione dell'accumulo di ARpolyQ, a una riduzione della morte cellulare (apoptosi) e ad un parziale recupero della morfologia muscolare. Attualmente stiamo testando nuovi approcci per "riparare" la proteina ARpolyQ, cercando di stimolare la produzione di una forma della proteina, detta AR-A, che è più corta di quella normale e non contiene il tratto poliQ tossico. Contrariamente a quanto descritto per ARpolyQ, abbiamo scoperto che AR-A è solubile e meno incline a formare aggregati e

specie insolubili. Come l'AR normale e l'ARpolyQ, anche l'AR-A è attivato dagli androgeni e mantiene la sua attività. Abbiamo dimostrato che la contemporanea presenza di AR-A e ARpolyQ riduce le specie aggregate e insolubili di ARpolyQ, considerate responsabili della sua tossicità. Abbiamo anche disegnato strategie per modificare la produzione di AR-A con specifici acidi nucleici o farmaci approvati dalla FDA e composti naturali, che saranno poi testati in modelli cellulari e animali di SBMA.

Disease Name:

Spinal and Bulbar Muscular Atrophy

Nome malattia:

Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare

Project number:

GGP19128

24. INVESTIGATION OF TRANSLATIONAL DEFECTS IN MULTIPLE MODELS OF SMA

Donzel D.*^[1], Paganin M.^[1], Lauria F.^[1], Signoria I.^[2], Sharma G.^[1], Bruno I.^[1], Van Der Hoorn D.^[3], Tebaldi T.^[5], Detering N.^[6], Huang Y.T.^[3], Marchioretto M.^[1], Pavarino G.^[4], Ruatti C.^[4], Fuller H.^[7], Claus P.^[6], Quattrone A.^[5], Inga A.^[5], Boido M.^[4], Groen E.^[2], Gillingwater T.^[3], Viero G.^[1]

^[1]IBF-CNR ~ Trento ~ Italy, ^[2]Department of Neurology and Neurosurgery, UMC Utrecht Brain Center ~ Utrecht ~ Netherlands, ^[3]Edinburgh Medical School, Biomedical Sciences & Euan MacDonald Centre for Motor Neuron Disease Research, University of Edinburgh ~ Edinburgh ~ United Kingdom, ^[4]Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi & University of Turin ~ Torino ~ Italy, ^[5]University of Trento ~ Trento ~ Italy, ^[6]SMATHERIA, gGmbH - Non-Profit Biomedical Research Institute ~ Hannover ~ Germany, ^[7]University of Keele ~ Keele ~ United Kingdom

Dysregulation of protein synthesis is known to be involved in many neurodegenerative diseases, and Spinal Muscular Atrophy (SMA) is no exception. Deficient levels of Survival Motor Neuron protein (SMN) were observed to lead to defective translation in primary motor and cortical neurons, and at an early stage of disease in the brain of Taiwanese model of SMA. Furthermore, we demonstrated that SMN is a Ribosome Associated Protein (RAP), and that SMN-primed ribosomes direct the translation of transcripts characterized by specific features. In this work, we wanted to clarify whether translation has a central role in SMA pathogenesis taking advantage of multiple tissues, stages and models. Then, we aimed at identifying other proteins SMN cooperates with to regulate translation.

We first performed polysomal profiling and we computed the fraction of ribosome in polysomes in brain, spinal cord and liver, at pre, early and late stage of disease in the Taiwanese, $\Delta 7$ and 2b mouse models of SMA, finding a remarkable decrease of this parameter across these multiple conditions. Next, we performed ribosome profiling and identified a set of genes with altered ribosome occupancy in all the conditions. By functional enrichment analysis we detected the presence of commonly affected organelles and cellular compartments across the different stages, tissues and models, demonstrating that translation plays a crucial role in SMA pathogenesis in all the conditions considered in our multi-dimensional analyses.

Secondly, to identify putative direct SMN interactors on ribosomes we intersected proteomics datasets obtained from SMN-primed ribosome immunoprecipitation, biotin ligation assay and limited proteolysis, identifying eIF3e. We confirmed the association of SMN and eIF3e to ribosomes and ribosomal subunits in multiple control tissues and the loss of their association in SMA, suggesting that decreased levels of SMN lead to a corresponding alteration in the co-sedimentation profile of eIF3e with ribosomes. These results highlight the existence of a functional interplay between SMN and eIF3e on ribosomes, strengthening our hypothesis that SMN plays a

crucial role in translation regulation.

Indagine dei difetti traduzionali in modelli di SMA

È noto che la deregolazione della sintesi proteica è coinvolta in molte malattie neurodegenerative. L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) non fa eccezione. È stato osservato che una carenza di proteina Survival Motor Neuron (SMN) portava a una traduzione difettosa nei neuroni motori e corticali e nel cervello del modello taiwanese di SMA in una fase iniziale della malattia. Inoltre, abbiamo dimostrato che SMN è una proteina associata al ribosoma (RAP) e che i ribosomi legati da SMN dirigono la traduzione di trascritti caratterizzati da particolari caratteristiche. In questo lavoro, abbiamo voluto chiarire se la traduzione ha un ruolo centrale nella patogenesi della SMA sfruttando molteplici tessuti, stadi e modelli. Quindi, abbiamo cercato di identificare altre proteine con cui SMN collabora per regolare la traduzione.

Abbiamo eseguito polysome profiling e abbiamo calcolato la frazione di ribosomi associata ai polisomi nel cervello, nel midollo spinale e nel fegato, a diversi stadi della malattia (pre-sintomatico, sintomatico, stadio avanzato) nei modelli murini taiwanesi, Δ7 e 2b di SMA, trovando una notevole diminuzione di questo parametro attraverso queste molteplici condizioni. Successivamente, abbiamo eseguito ribosome profiling e identificato un insieme di geni con alterata ribosome occupancy in tutte le condizioni. Mediante l'analisi dell'arricchimento funzionale abbiamo rilevato la presenza di organelli e compartimenti cellulari comunemente colpiti attraverso i diversi stadi, tessuti e modelli, dimostrando che la traduzione gioca un ruolo cruciale nella patogenesi della SMA in tutte le condizioni considerate nelle nostre analisi multidimensionali.

In secondo luogo, per identificare i presunti interattori SMN sui ribosomi, abbiamo intersecato i set di dati di proteomica ottenuti dall'immunoprecipitazione dei ribosomi legati da SMN, dal biotin ligation assay e dalla limited proteolysis, identificando eIF3e. Abbiamo confermato l'associazione di SMN ed eIF3e ai ribosomi e alle subunità ribosomiali in più tessuti di controllo e abbiamo dimostrato la perdita della loro associazione nella SMA. Questi dati suggeriscono che livelli ridotti di SMN portano a una corrispondente alterazione nel profilo di co-sedimentazione di eIF3e con i ribosomi. Questi risultati evidenziano l'esistenza di un'interazione funzionale tra SMN ed eIF3e sui ribosomi, rafforzando la nostra ipotesi che SMN svolga un ruolo cruciale nella regolazione della traduzione.

Disease Name:

Spinal Muscular Atrophy

Nome malattia:

Atrofia Muscolare Spinale

Project number:

GGP19115

25. SMN CIRCULAR RNAS AS POTENTIAL NEW TARGETS AND BIOMARKERS FOR THE THERAPEUTIC RESPONSE IN SPINAL MUSCULAR ATROPHY

Guerra M.^[1], Marini A.^[1], Pitolli C.^[1], Pera M.C.^[3], Abiusi E.^[2], Tiziano F.D.^[2], Mercuri E.^[3], Pagliarini V.^[1], Sette C.^[1]

^[1]Department of Neuroscience, Section of Human Anatomy, Catholic University of the Sacred Heart ~ 00168 Rome ~ Italy, ^[2]Department of Life Sciences and Public Health, Section of Genomic Medicine, Fondazione Policlinico "A. Gemelli" IRCCS ~ 00168, Rome ~ Italy, ^[3]Pediatric Neurology Institute, Catholic University and Nemo Pediatrico, Fondazione Policlinico Gemelli IRCCS ~ 00168, Rome ~ Italy

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disease caused by deletions of the human Survival Motor Neuron 1 (SMN1) gene, which encodes the ubiquitously expressed SMN protein. However, reduced expression of SMN primarily affects the viability of spinal motor-neurons, resulting in a severe muscle atrophy. Several treatments for SMA have been approved, but although these ameliorate the course of the disease in most patients, they do not yet represent a cure. Thus, a deeper knowledge of the molecular mechanism/s underlying SMN expression regulation and the identification of prognostic biomarkers to better stratify SMA patients might improve their clinical management. Our laboratory has recently identified numerous circular transcripts deriving from the SMN locus (SMN circRNAs). Interestingly, for their biochemical properties circRNAs tend to accumulate in long-lived cells (i.e. post-mitotic neurons) and they are abundant in body fluids (i.e. blood). Based on this evidence, we investigated the functional relevance of SMN circRNAs in human SMA fibroblasts and induced pluripotent stem cells (iPSCs). Our results show that SMN circRNAs are ubiquitously expressed in all SMA cell lines tested and that the most of them have a predominantly cytoplasmic localization, with two SMN circRNAs exclusively expressed in the nuclear compartment. Moreover, SMN circRNAs are not associated with the active translational machinery, but are enriched in the soluble ribosomal fraction, suggesting that, although not translated, they might play a role as regulators of the general translation. Lastly, we evaluated the expression of the most abundant SMN circRNAs in the total and neuronal extra-cellular vesicles (EVs) extracted from blood of SMA patients. Our results show that, at least one of the SMN circRNAs, is abundant in both types of EVs. Further studies on SMA patients with different clinical responses to therapy will give us informations about their potential as prognostic biomarkers.

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia neuromuscolare causata da delezioni del gene umano Survival Motor Neuron 1 (SMN1), che codifica per la proteina SMN ubiquitariamente espressa. Tuttavia, la ridotta espressione di SMN influisce principalmente sulla vitalità dei motoneuroni spinali, determinando una grave atrofia muscolare. Sono stati approvati diversi trattamenti per la SMA, ma sebbene questi migliorino il decorso della malattia nella maggior parte dei pazienti, non rappresentano ancora una cura. Pertanto, una conoscenza più approfondita dei meccanismi molecolari alla base della regolazione dell'espressione di SMN e l'identificazione di biomarcatori prognostici per stratificare meglio i pazienti SMA potrebbero migliorare la loro gestione clinica. Il nostro laboratorio ha recentemente identificato numerosi trascritti circolari (circRNAs) derivanti dal locus SMN. Per le loro proprietà biochimiche, i circRNAs tendono ad accumularsi nelle cellule con una bassa capacità replicativa (come ad esempio i motoneuroni alpha localizzati nelle corna anteriori del midollo spinale) e sono abbondanti nei fluidi corporei. Sulla base di queste osservazioni, abbiamo studiato la rilevanza funzionale dei circRNAs di SMN nei fibroblasti SMA umani e nelle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). I nostri risultati mostrano che i circRNAs di SMN sono ubiquitariamente espressi in tutte le linee cellulari SMA testate e che la maggior parte di essi ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica, eccetto per due di loro la cui espressione risulta essere esclusivamente nucleare. Inoltre, i circRNAs di SMN non sono associati al meccanismo traduzionale attivo, ma sono arricchiti nella frazione ribosomiale solubile, suggerendo che, sebbene non tradotti, potrebbero svolgere un ruolo funzionale come regolatori della traduzione generale. Infine, abbiamo valutato l'espressione dei circRNAs di SMN più abbondanti nelle vescicole extracellulari totali e neuronali (EV) estratte dal sangue dei pazienti SMA. I nostri risultati mostrano che almeno uno dei circRNA di SMN è abbondante in entrambi i tipi di EV. Ulteriori studi su pazienti SMA con diverse risposte cliniche alla terapia potranno fornirci informazioni sul loro potenziale come biomarcatori prognostici.

Disease Name:

Spinal Muscular Atrophy

Nome malattia:

Atrofia Muscolare Spinale

Project number:

GGP20055

26. PEROXISOMAL-MITOCHONDRIAL INTERACTION IMPINGING ON MUSCLE FUNCTION

Scalabrin M.^[1], Trani G.^[1], Gherardi G.^[1], Franco Romero A.^[1], Baschiera E.^[2], Salviati L.^[2], Jaspers Y.^[3], Kemp S.^[3], Romanello V.*^[1]

^[1]Department of Biomedical Sciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]Dipartimento della Donna e il Bambino ~ Padova ~ Italy, ^[3]Laboratory Genetic Metabolic Diseases ~ Amsterdam ~ Netherlands

Adjustments in muscle mass and metabolic demand are crucial for regulating whole-body metabolism, locomotion, eating, and respiration. Therefore, it is not surprising that skeletal muscle is emerging as a central influencer of several human diseases. Muscle dysfunction correlates with the onset and progression of several metabolic disorders while improving muscle health with regular exercise reduces morbidity in several conditions. Peroxisomes are ubiquitous dynamic metabolic organelles that play an essential role in various cellular events, such as reactive oxygen species clearance and lipid metabolism. However, even though the peroxisome field is exponentially increasing, little is known about their role in muscle metabolism and function. Here we show that in vivo inhibition of peroxisomal function exclusively in skeletal muscle results in alterations in the peroxisomal-mitochondrial interplay resulting in reduced critical energy production pathways. In addition, peroxisome-deficient muscles display an age-dependent myopathy characterized by sarcomere structure alterations, central nuclei, oxidative stress, and denervation signs, impinging on muscle function. These findings indicate that peroxisomal integrity is critical for skeletal muscle health.

Ruolo dell'interazione fra i perossisomi e i mitocondri nella funzione muscolare

Il mantenimento della massa muscolare è cruciale per la locomozione, l'alimentazione, la respirazione e per regolare il metabolismo di tutto il corpo. Pertanto, non sorprende che la disfunzione muscolare sia correlata all'insorgenza e alla progressione di diversi disordini metabolici, mentre il miglioramento della salute muscolare con un regolare esercizio fisico riduce la morbilità in diverse condizioni. I perossisomi sono organelli che svolgono un ruolo essenziale nel metabolismo degli acidi grassi e dei radicali liberi. Tuttavia, il loro ruolo nel metabolismo e nella funzione muscolare è ancora sconosciuto. Qui mostriamo che l'inibizione della funzione dei perossisomi nel muscolo scheletrico provoca alterazioni nell'interazione fra i perossisomi e i mitocondri con conseguente alterazione nelle vie di produzione dell'energia cellulare, alterando la struttura e la funzione muscolare. Questi risultati indicano che l'integrità dei perossisomi è fondamentale per la salute del muscolo scheletrico.

Disease Name:

Zellweger Spectrum Disorders

Nome malattia:

Spettro della Sindrome di Zellweger

Project number:

GMR22T1055

Genetic neurological disorder

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

Magnifico M.C.^[1], Barile S.N.^[1], Poeta E.^[2], Balboni N.^[2], Giorgi F.M.^[2], Protti M.^[2], Micolini L.^[2], Babini G.^[2], Viggiano L.^[1], Pignataro A.^[1], Pisano I.^[1], Porcelli V.^[1], Massenzio F.^[2], De Chirico F.^[2], Volpe G.^[1], Fiermonte G.^[1], Palmieri L.^[1], Lasorsa F.M.*^[1], Monti B.^[2]

^[1]Università di Bari "Aldo Moro", Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente ~ Bari ~ Italy, ^[2]Alma mater studiorum - Università di Bologna, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie ~ Bologna ~ Italy

AGC1 deficiency is a rare encephalopathy (DEE39,OMIM# 612949) caused by mutations in the nuclear SLC25A12 gene, encoding the mitochondrial aspartate/glutamate carrier 1 (AGC1). It manifests in infants with neuromuscular delay, epilepsy, and hypomyelination associated with reduction of brain N-acetyl-aspartate, precursor of myelin lipids in CNS. AGC1 impairment is associated with epigenetic alterations in brain precursor cells with consequent transcriptional dysregulation leading to proliferation and differentiation defects in both Neural and Oligodendrocytes Precursor Cells (NPCs and OPCs), although with different mechanisms. In in vitro and in vivo murine models of the disease, we have investigated transcriptional and epigenetic targets potentially influencing myelination, as well as the altered biochemical pathways, through multi-omic approaches. As a further approach, we used iPSC-derived NPCs from two patients carrying different missense mutations in SLC25A12 in which we demonstrated proliferation defects with higher cell death, and a deficit in mitochondrial pyruvate oxidation accompanied by profound transcriptional and metabolic dysregulations compared to NPCs from healthy individuals. Given the effect of ketogenic diet that improves myelination and clinical features in AGC1 deficiency, we evaluated in patient-derived NPCs the impact of ketone bodies with the result that these compounds significantly enhanced mitochondrial respiration and proliferation. Our multidisciplinary approach allowed us to identify the altered mechanisms leading to dysregulation of myelin synthesis in AGC1 deficiency, thus indicating the potential targets to counteract AGC1 deficiency hypomyelination and eventually develop more appropriate and personalized therapies for patients. Since AGC1 deficiency shares many clinical features with other rare neurological diseases, including hypomyelination, these targets could be also tested in other similar pathologies.

APPROCCI MULTIDISCIPLINARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI NUOVI POTENZIALI BERSAGLI TERAPEUTICI PER CONTRASTARE LA DISREGOLAZIONE DEI PROGENITORI DELLE CELLULE CEREBRALI NELL'IPOMIELINAZIONE DA DEFICIENZA DI AGC1

Il deficit di AGC1 è una rara encefalopatia (DEE39,OMIM# 612949) causata da mutazioni nel gene nucleare SLC25A12, che codifica per il trasportatore mitocondriale dell'aspartato/glutammato 1 (AGC1). La malattia si manifesta nei neonati con ritardo neuromuscolare, epilessia e ipomielinizzazione associata alla riduzione dell'N-acetil-aspartato (NAA) nel cervello. Tale riduzione può determinare l'ipomielinizzazione, essendo NAA precursore dei lipidi della mielina nel sistema nervoso, ed essere coinvolta con l'alterazione del controllo epigenetico dell'espressione genica, poichè da esso possono derivare i gruppi acetile che servono per l'acetilazione degli istoni. Come osservato in modelli murini in vitro e in vivo della malattia, difetti di AGC1 causano alterazioni in precursori di cellule cerebrali che presentano difetti di proliferazione e differenziamento sia in neuroni (NPC) che in oligodendrociti (OPC), sebbene attraverso differenti meccanismi. Negli stessi modelli sperimentali, abbiamo inoltre evidenziato alterazioni della regolazione epigenetica della trascrizione genica e di pathway biochimici che potenzialmente influenzano la proliferazione cellulare e la mielinizzazione. Come ulteriore approccio sperimentale, abbiamo differenziato NPC

da cellule staminali pluripotenti indotte di due pazienti recanti distinte mutazioni

missenso in SLC25A12: gli studi su queste cellule hanno rivelato difetti di proliferazione associati a maggiore morte cellulare, e un deficit nell'ossidazione del piruvato nei mitocondri accompagnato da profonde alterazioni trascrizionali alla base di un rewiring metabolico. Dati gli effetti positivi che la dieta chetogenica provoca nella malattia con aumentata mielinizzazione e miglioramento dei sintomi clinici nei pazienti, abbiamo valutato l'impatto nelle NPC di paziente dei corpi chetonici e abbiamo dimostrato che tali composti migliorano significativamente l'attività mitocondriale e la proliferazione cellulare. Il nostro approccio multidisciplinare ci ha permesso di identificare meccanismi alterati che portano a difetti nella produzione di mielina nella AGC1 deficiency, permettendo di identificare potenziali bersagli per contrastare l'ipomielinizzazione e sviluppare terapie più appropriate e personalizzate per i pazienti. Poiché la AGC1 deficiency condivide diverse caratteristiche cliniche con altre malattie neurologiche rare, anche a carattere ipomielinizzante, questi potenziali bersagli terapeutici possono essere considerati anche per lo studio e il trattamento di altre patologie simili.

Disease Name:

AGC1-deficiency

Nome malattia:

Deficit di AGC1

Project number:

GGP19067

28. DISSECTING INNATE IMMUNITY AND NUCLEIC ACID SENSING IN GENE THERAPY AND DISEASE

Mapelli A., Castiglioni I., Tahraoui--Bories J., Abou--Alezz M., Valeri E., Merelli I., Giordano A.M.S., Kajaste--Rudnitski A.*

SR-TIGET, Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy

Deregulation of cell intrinsic pathways of nucleic acid sensing is emerging as a potential driver of several autoinflammatory and autoimmune diseases. Among these, the Aicardi-Goutières Syndrome (AGS) is a rare monogenic encephalopathy in which aberrant activation of innate sensing is thought to drive disease. AGS is caused by mutations in any one of nine genes (TREX1, RNASEH2A/B/C, SAMHD1, ADAR1, IFIH1, LSM11 and RNU7-1) encoding for proteins involved in the metabolism and detection of nucleic acids. Nevertheless, the precise molecular mechanisms and cell types triggering disease remain elusive due to the lack of viable animal models recapitulating human neuropathology. In this context, we have generated human induced pluripotent stem cells (hiPSC) harboring TREX1 or RNASEH2B loss of function alleles which allow us to faithfully recapitulate the development of different central nervous system (CNS) cell types. This experimental system has allowed us to identify DNA damage as a major driver of pro-inflammatory activation in AGS astrocytes. This activation triggers complex signaling cascades impacting multiple CNS cell subsets analyzed at the single-cell level and ultimately leads to neurotoxicity. Several metabolic pathways were significantly altered in all AGS-patient derived cell populations. Among these, glycolytic, hypoxic and mTORC1 signaling pathways were upregulated across AGS genotypes. However, the molecular links between AGS gene defects and neuroinflammation still remain unclear. We are currently investigating the involvement of observed metabolic alterations in AGS neuropathology and addressing how AGS gene defects lead to increased DNA damage. To this end we are exploiting the iPSC-derived model of AGS and have

generated cell lines knock-out for AGS-causing genes. Together, our results will fill important knowledge gaps regarding the potential contribution of metabolic dysregulations leading to the neurotoxicity in AGS and shed light on how AGS gene defects lead to DNA damage. Ultimately, determining precisely the molecular mechanisms leading to AGS pathogenesis will inform the development of targeted therapies to prevent the onset and progression of this deadly disease.

La disregolazione delle vie/pathway intracellulari di riconoscimento degli acidi nucleici sta emergendo come potenziale causa scatenante di diverse malattie autoinfiammatorie ed autoimmuni. Fra queste, la sindrome di Aicardi-Goutières (AGS) è una rara encefalopatia monogenica in cui si ritiene che un'attivazione anomala dell'immunità innata sia alla base dell'insorgenza della malattia. La sindrome di Aicardi-Goutières è causata da mutazioni in uno qualsiasi dei nove geni (TREX1, RNASEH2A/B/C, SAMHD1, ADAR1, IFIH1, LSM11 e RNU7-1) che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo e nel riconoscimento degli acidi nucleici. Tuttavia i precisi meccanismi molecolari e i tipi di cellule che causano la malattia rimangono da chiarire a causa della mancanza di modelli animali che ricapitolino il fenotipo neuropatologico umano. In questo contesto, abbiamo generato cellule umane staminali pluripotenti indotte (iPSC) portatrici di alleli con perdita di funzione per TREX1 o RNASEH2B che ci consentono di ricapitolare fedelmente lo sviluppo di diversi tipi cellulari del sistema nervoso centrale (SNC). Questo modello sperimentale ci ha permesso di identificare il danno al DNA come uno dei principali fattori scatenanti dell'attivazione pro-infiammatoria negli astrociti AGS. Questa attivazione innesca complesse cascate di segnalazione che hanno un impatto su più popolazioni del SNC analizzate a livello di singola cellula, con l'effetto finale di causare neurotossicità. In tutte le popolazioni cellulari derivate da cellule di pazienti affetti da AGS abbiamo osservato una significativa alterazione di diversi pathways metabolici. Tra questi sono risultati sovregolati in tutti i genotipi AGS il pathway glicolitico, ipossico e il pathway di mTOR. Tuttavia, il collegamento molecolare tra i difetti genetici della malattia e il fenotipo neuroinfiammatorio rimangono da chiarire. Attualmente stiamo studiando il coinvolgimento delle alterazioni metaboliche osservate nella neuropatologia dell'AGS e stiamo studiando come le mutazioni nei geni dell'AGS portino ad un aumento del danno al DNA. A questo scopo stiamo sfruttando i modelli di AGS derivati da iPSC e abbiamo generato linee cellulari knock-out per i geni che causano la malattia. Nell'insieme, i nostri studi permetteranno di chiarire meglio il potenziale contributo delle disregolazioni metaboliche nella neurotossicità osservata nella sindrome Aicardi-Goutières e faranno luce su come i difetti genetici dalla malattia portino ad un danno al DNA. In conclusione riteniamo che l'identificazione dei precisi meccanismi molecolari che guidano la patogenesi dell'AGS possa promuovere lo sviluppo di terapie mirate a prevenire l'insorgenza e la progressione di questa malattia mortale.

Disease Name:

Aicardi-Goutières Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Aicardi-Goutières

Project number:

TGT22C11

29. EXPERIMENTAL GENE THERAPY IN MITOCHONDRIAL DISORDERS

Corrà S., Balmaceda V., Cerutti R., Brischiigliaro M., Viscomi C., [Zeviani M.*](#)

University of Padova ~ Padova ~ Italy

A number of different pharmacological and genetic approaches have been attempting to mitigate or cure mitochondrial disorders. Interesting results have been obtained for improvement of isolated or predominant mitochondrial myopathies, for instance by using the pro-autophagic anti-TORC1 rapamycin (1), activators of the mitochondriogenic PGC1- α (2), moderate overexpression of the cristae organizer OPA1 (3), or, as a preliminary result, AAV-conveyed gene replacement (in a model of muscle-specific COX deficiency, unpublished). The main problem remains the penetration of the blood-brain barrier to target nerve cells in the CNS. Leigh disease, a genetically heterogeneous condition characterized by defective mitochondrial bioenergetics, is the most common oxidative-phosphorylation disease in infancy. Leigh's brain lesions are mimicked by the ablation of the mouse respiratory chain subunit Ndufs4 $^{-/-}$ (4), which is part of, and crucial for, normal Complex I activity and assembly, particularly in the brains of both children and mice. We previously conveyed the human NDUFS4 gene to the mouse brain using either single-stranded adeno-associated viral 9 recombinant vectors (5) or the PHP.B adeno-associated viral vector (6). Both these approaches significantly prolonged the lifespan of the Ndufs4 $^{-/-}$ mouse model but the extension of the survival was limited to a few weeks by the former approach, whereas the latter was applicable to a limited number of mouse strains, but not to primates. We then exploited the recent development of new, self-complementary adeno-associated viral 9 vectors, in which the transcription rate of the recombinant gene is markedly increased and can be applied to all mammals, including humans. Either single intra-vascular or double intra-vascular and intra-cerebro-ventricular injections were performed at post-natal Day 1 (7). The first strategy ubiquitously conveyed the human NDUFS4 gene product in Ndufs4 $^{-/-}$ mice, doubling the lifespan from 45 to \approx 100 days after birth, when the mice developed rapidly progressive neurological failure. However, the double, contemporary intra-vascular and intra-cerebroventricular administration of self-complementary-adeno-associated viral NDUFS4 prolonged healthy lifespan up to 9 months of age. These mice were well and active at euthanization, at 6, 7, 8 and 9 months of age, to investigate the brain and other organs post-mortem. Robust expression of hNDUFS4 was detected in different cerebral areas preserving normal morphology and restoring Complex I activity and assembly. Nevertheless, an additional series of treated animals from the same strain gave inconsistent results, with several subjects deceased early, similar to untreated peers. We are exploring the possible causes of such inconsistency. In any case, our results warrant further investigation on the translatability of self-complementary-adeno-associated viral 9 NDUFS4-based therapy in the prodromal phase of the disease in mice and eventually humans.

Diversi approcci farmacologici e genetici hanno tentato di mitigare o curare i disturbi mitocondriali. Sono stati ottenuti risultati interessanti per miopatie mitocondriali, ad esempio utilizzando la rapamicina, un inibitore pro-autofagico di mTORC1, attivatori mitocondriogenici di PGC1- α , la moderata sovraespressione dell'organizzatore delle creste OPA1 o la sostituzione genica ad opera di AAV ricombinante. Il problema principale rimane la penetrazione della barriera emato-encefalica per colpire le cellule nervose nel SNC. La malattia di Leigh, una condizione geneticamente eterogenea caratterizzata da una bioenergetica mitocondriale difettosa, è la più comune malattia mitocondriale nell'infanzia. Le lesioni cerebrali sono riprodotte dall'ablazione della subunità Ndufs4 della catena respiratoria, che è parte e cruciale per la normale attività e assemblaggio del Complesso I, in particolare nel cervello di bambini e topi. In precedenza, abbiamo veicolato il gene NDUFS4 umano al cervello del topo utilizzando vettori ricombinanti virali adeno-associati AAV9 a filamento singolo o il vettore virale adeno-associato PHP.B. Entrambi questi approcci hanno prolungato significativamente la durata della vita del modello di topo Ndufs4 $^{-/-}$ ma l'estensione della sopravvivenza è stata limitata a poche settimane dal primo approccio, mentre il secondo è applicabile a un numero limitato di ceppi di topi, ma non può agire sui primati. Abbiamo quindi sfruttato il recente sviluppo di nuovi vettori virali adeno-associati auto-complementari (sc)AAV9, in cui il tasso di trascrizione del gene ricombinante è notevolmente aumentato e può essere applicato a tutti i mammiferi, compreso l'uomo. Al giorno 1 post-natale sono state eseguite singole iniezioni intravascolari o doppie intravascolari e intracerebroventricolari. La prima strategia ha trasmesso

ubiquitariamente il prodotto del gene NDUFS4 umano nei topi *Ndufs4*^{-/-}, raddoppiando la durata della vita da 45 a ≈ 100 giorni dopo la nascita, quando si sviluppa un'insufficienza neurologica rapidamente progressiva. Tuttavia, la doppia, contemporanea somministrazione intravascolare e intracerebroventricolare di NDUFS4 virale scAAV ha prolungato la durata della vita sana fino a 9 mesi di età. Questi topi erano sani e attivi all'eutanasia, a 6, 7, 8 e 9 mesi di età, per indagare il cervello e altri organi post mortem. L'espressione robusta di hNDUFS4 è stata rilevata in diverse aree cerebrali che preservavano la normale morfologia e ripristinavano l'attività e l'assemblaggio del complesso I. Tuttavia, un'ulteriore serie di animali trattati dello stesso ceppo ha dato risultati incoerenti, con diversi animali deceduti prematuramente, simili ai coetanei non trattati. Stiamo esplorando le possibili cause di tale incoerenza. In ogni caso, i nostri risultati giustificano ulteriori indagini sulla traducibilità della terapia basata su NDUFS4 virale scAAV9 nella fase prodromica della malattia nei topi ed eventualmente nell'uomo.

Disease Name:

Complex I deficiency

Nome malattia:

Deficit isolato di complesso I mitocondriale

Project number:

GGP19007

30. PATHOLOGICAL MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING APOPT1/COA8 LOSS OF FUNCTION

Brischigliaro M.^[1], Cabrera--Orefice A.^[2], Franchin C.^[1], Roverso M.^[3], Bogialli S.^[3], Pastore P.^[3], Arrigoni G.^[1], Arnold S.^[4], Viscomi C.^[1], Zeviani M.^[5], Fernandez--Vizarra E.*^[1]

^[1]Department of Biomedical Sciences, University of Padova. ~ Padova ~ Italy, ^[2]Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center ~ Nijmegen ~ Netherlands, ^[3]Department of Chemical Sciences. University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[4]Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne ~ Cologne ~ Germany, ^[5]Department of Neurosciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy

Mitochondrial disorders (MD) are rare genetic conditions caused by dysfunction of the oxidative phosphorylation system. These diseases are clinically and genetically very heterogeneous and can be originated by mutations in either the mitochondrial genome or in genes encoded in the nucleus. Variants in more than 300 different nuclear genes have been associated with MD, some of them found in a single individual or family. Mutations in APOPT1 (aka COA8) have been described in eight individuals from seven different families, associated with cavitating leukoencephalopathy and respiratory chain complex IV (cIV) deficiency (Hedberg-Oldfors et al., 2020; Melchionda et al., 2014; Sharma et al., 2018). A recurrent observation in the APOPT1-mutated patients is the appearance and/or worsening of their neurological symptoms after febrile illness, most probably because of an impaired metabolic stress response. The role of APOPT1 in the assembly/stability of cIV remains largely unknown, although we were able to determine that its stability and import inside mitochondria is regulated by a complex interplay between the ubiquitin-proteasome system (UPS) and reactive oxygen species (ROS) (Signes et al., 2019). However, the molecular details regulating these processes had not been yet elucidated. We sought to investigate the molecular function and stress-driven regulation of APOPT1 using human patient-derived cultured cells and an Apopt1KO *Drosophila melanogaster* model. Detailed proteomic analysis of cIV in these models, as well as of the specific interactors of APOPT1 have revealed that the biochemical deficiency stems from an early defect in cIV assembly due to low levels of heme A, a necessary cofactor for the

formation of the catalytic center of cIV. In addition, we have been able to determine that the stabilization of APOPT1 in response to oxidative stress is due to the presence of certain Cys residues located in the proximity of the mitochondrial targeting sequence. In normal conditions, cIV activity is augmented in oxidatively stressed cells. This effect is blunted when APOPT1 is absent or not able to respond to the oxidative challenge. These results provide a strong indication that APOPT1 is a ROS-sensing factor necessary to stimulate CIV biogenesis and activation, protecting the cells from stress.

Patogenesi molecolare associata alla perdita di funzione di APOPT1/COA8

I mitocondri sono organelli fondamentali per la vita, essendo responsabili dell'estrazione dell'energia dagli alimenti per mantenere la funzionalità delle cellule nel corpo (ad eccezione dei globuli rossi, che non hanno mitocondri). Le malattie mitocondriali (MM) sono un gruppo di patologie rare causate da difetti nei mitocondri. I mitocondri contengono molte proteine, sintetizzate sia dentro l'organello, da geni contenuti nel DNA mitocondriale, che fuori, nel citoplasma, da geni presenti nel nucleo. Il malfunzionamento di qualcuna di queste proteine dovuto a delle mutazioni nel gene codificante può causare una MM. Queste malattie genetiche possono colpire qualsiasi organo, ma quelli più frequentemente colpiti sono il cervello e i muscoli. Un'osservazione ricorrente nelle MM è la comparsa o peggioramento dei sintomi neurologici e/o muscolari dopo uno stress metabolico causato da un'infezione con febbre. Il perché di questo fenomeno non è chiaro e la prevenzione del conseguente deterioramento diventa un problema medico complesso. L'obiettivo di questo progetto è studiare la funzione della proteina chiamata APOPT1 o COA8, candidata come protettrice dallo stress mitocondriale. Mutazioni che prevengono la formazione di questa proteina sono state trovate in un gruppo di pazienti con MM in cui il decorso clinico peggiora dopo episodi febbrili. Grazie a dettagliate analisi molecolari sia in cellule in coltura derivate da pazienti, che in moscerini della frutta abbiamo identificato l'origine del difetto biochimico nei mitocondri. Inoltre, siamo stati in grado di stabilire che senza la funzione di APOPT1, le cellule non riescono a rispondere a uno stress ossidativo dovuto all'esposizione al perossido di idrogeno, confermando che questa proteina è un fattore importante per proteggere le cellule dallo stress acuto.

Disease Name:

Complex IV deficiency, nuclear type

Nome malattia:

Deficit del complesso IV mitocondriale, tipo nucleare 17

Project number:

GJC21014

31. THE LNCRNA PHOX2B-AS1 IN THE PATHOGENESIS AND AS POTENTIAL DRUG TARGET IN CONGENITAL CENTRAL HYPOVENTILATION SYNDROME (CCHS)

Di Lascio S.*^[1], Cuadros Gamboa A.L.^[1], Bertocchi M.^[1], Benfante R.^[2], Fornasari D.^[1]

^[1]Dept. of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan ~ Milan ~ Italy, ^[2]CNR - Institute of Neuroscience ~ Veduggio al Lambro (MB) ~ Italy

Congenital Central Hypoventilation Syndrome (CCHS) is a rare and devastating neonatal neurological disease characterized by a breathing defect control of the autonomic nervous system, essential during sleep, in association with symptoms of a more generalized autonomic dysfunction

[1]. Generally, children with the disease have near-normal breathing when awake, while they hypoventilate during sleep. Since no pharmacological treatment has been found to be effective, mechanical ventilation supports are the only options available for children with this disease. In patients, heterozygous polyalanine expansion mutations (PARMs) have been identified in the PHOX2B gene, which encodes a transcription factor essential for the development of the autonomic nervous system, which cause the expression of mutated proteins with toxic activity [1]. Bioinformatics analyses and preliminary data allowed us to identify a long non-coding RNA (PHOX2B-AS1), transcribed in the opposite direction and partially complementary to the PHOX2B gene transcript, promoting PHOX2B translation.

Our project aims to evaluate the role of PHOX2B-AS1 in the pathogenesis of CCHS and the effects of its modulation on the expression of normal and mutated proteins. Due to the unavailability of viable CCHS mice models, to pursue this goal, we will use human autonomic sympathetic neurons cultures differentiated from stem cells (iPSCs) obtained by reprogramming fibroblasts from CCHS patients [2]. The results of this research will allow us to evaluate the role of AS1 in the expression of PHOX2B during neuronal differentiation of healthy and disease-derived iPSCs, to explore the possibility of PHOX2B-AS1 therapeutic targeting, to reduce the toxic effect of mutant protein.

L'RNA lungo non codificante (lncRNA) antisense naturale PHOX2B-AS1 nella patogenesi e come potenziale bersaglio terapeutico nella Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)

La Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS) è una malattia neurologica neonatale rara e devastante, caratterizzata da un difetto del controllo della respirazione da parte del Sistema Nervoso Autonomo, essenziale durante il sonno, in associazione a sintomi di una più generalizzata disfunzione autonoma.

Generalmente i bambini affetti dalla malattia hanno una respirazione pressoché normale quando svegli, mentre ipoventilano durante il sonno. Poiché nessun trattamento farmacologico è risultato efficace, i supporti per la ventilazione meccanica risultano essere le uniche opzioni disponibili per i bambini affetti da questa patologia. Nei pazienti sono state identificate mutazioni in eterozigosi nel gene PHOX2B, che codifica per un fattore di trascrizione essenziale per lo sviluppo del Sistema Nervoso Autonomo, che provocano l'espressione di proteine mutate con attività tossica. Analisi bioinformatiche e dati preliminari ci hanno permesso di identificare un RNA lungo non codificante (PHOX2B-AS1), trascritto in direzione opposta e parzialmente complementare al trascritto del gene PHOX2B, in grado di promuovere la produzione della proteina PHOX2B. Il nostro progetto si propone di valutare il ruolo di PHOX2B-AS1 nella patogenesi della CCHS e gli effetti della sua modulazione sull'espressione delle proteine normali e mutate. Per perseguire questo obiettivo ci avvarremo di culture neuronali umane differenziate da cellule staminali ottenute riprogrammando fibroblasti di pazienti affetti da CCHS. I risultati di questa ricerca permetteranno di valutare se PHOX2B-AS1 possa essere identificato come nuovo bersaglio terapeutico per il trattamento della CCHS.

Disease Name:

Congenital central hypoventilation syndrome

Nome malattia:

Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita

Project number:

GMR22T1041

32. EVALUATION OF IN VITRO NEURONAL CULTURES AS TESTING MODEL FOR PHARMACOLOGICAL TREATMENTS OF A GENETIC FORM OF MIGRAINE

Barbieri R.^[1], Misurale F.^[2], Alloisio S.^[2], Freilinger T.^[3], Pusch M.^[1], Gavazzo P.*^[1]

^[1]*Biophysics Institute ~ Genova ~ Italy*, ^[2]*ETT spa ~ Genova ~ Italy*, ^[3]*Neurological Department, klinikum Passau ~ Passau ~ Germany*

In vitro cultured neuronal networks are a valuable experimental model to unravel many aspects of brain physiology. However, it is unclear to which extent cultured neurons can reliably model genetic diseases. Indeed the establishment of an in vitro model based on cultured neurons presents some limitations which need to be taken into consideration. On the one hand, 2D-cultures cannot represent the full complexity of the brain. Another concern regards the experimental variability among different preparations of neuronal cultures. Taking these limitations into consideration, in this work, we tested the usefulness of cortical neuronal cultures obtained from genetically modified knockin-mice (KI) mimicking a human monogenetic migraine model.

The KI mice recapitulate familial hemiplegic migraine of type 3 (FHM3), a genetic form of migraine with aura caused by gain-of-function mutations in the SCN1A gene encoding the Nav1.1 channel [1]. In particular, we employed two KI mouse models of FHM3 bearing each one a mutation in the Scn1a gene encoding the Nav1.1 channel; for one of these mouse models, neurophysiological phenomena have been recently investigated [2], disclosing key differences between the heterozygous and the wild-type phenotype. In the present work, brain cortices were dissected from WT and FHM3-KI embryos at E17 and dissociated neurons were cultured in defined medium for up to 25 days. Cultures were then studied by whole-cell and outside-out patch clamp recording while population excitability was monitored using microelectrode arrays (MEAs). By patch-clamp recording, kinetic parameters of Na current activation and inactivation were determined for single neurons, while using MEA devices electrical activity of the whole cortical network was investigated. In particular, the effect of the Na current blocker GS967 on the spontaneous electrical activity of the network was investigated for the different genotypes (WT, heterozygous KI, homozygous KI). In addition, the expression level of brain Nav channel genes, namely Scn1a, 2a, 3a, and 8a was estimated by RT-qPCR to detect possible dysregulation caused by FHM3 disease. Overall, the results suggest that the in vitro model can recapitulate several features observed in the FHM3 mouse models and it is worth emphasizing that, despite its limitation, the use of dissociated cultures may be a valid alternative method to reduce the number of animals used in experimental studies.

Utilizzo di colture neuronali in vitro per la valutazione di trattamenti farmacologici per una forma genetica di emicrania emiplegica.

Le colture di neuroni corticali costituiscono un valido modello sperimentale per lo studio di molti aspetti della fisiologia del cervello. Non è chiaro tuttavia quanto queste possano effettivamente essere utilizzate per lo studio di malattie genetiche del sistema nervoso in quanto senz'altro presentano limiti che vanno tenuti in considerazione. Infatti da un lato la bidimensionalità della coltura non può riprodurre interamente la complessità del cervello, dall'altro la variabilità tra una preparazione e l'altra può interferire con la riproducibilità dei risultati. Consapevoli di questi limiti, in questo studio abbiamo verificato le potenzialità di colture neuronali corticali ottenute da due modelli di topo geneticamente modificati mediante l'inserimento nel loro genoma di due diverse mutazioni che provocano nell'uomo l'Emicrania Emiplegica familiare di tipo 3 (FHM3).

FHM3 è una forma genetica di emicrania con aura causata da una mutazione del gene SCNA1 che codifica Nav1.1, un canale ionico presente nei neuroni [1]. Per uno dei due modelli di topo utilizzati nella nostra ricerca, grazie allo studio finanziato da Telethon, sono già stati approfonditi i principali aspetti neurofisiologici [2] correlati con la malattia FHM3. Nel lavoro che qui presentiamo abbiamo utilizzato come modello di studio le colture neuronali provenienti da cortecce di embrioni E17. Le cortecce sono stati dissociate in singoli neuroni i quali sono stati poi messi in coltura e

mantenuti in un terreno specifico per 25 giorni. L'attività elettrica delle colture in maturazione è stata testata a livello di singola cellula mediante patch-clamp o a livello di rete neuronale utilizzando un sistema di registrazione multielettrodo (microelectrode array, MEA). Infine con l'obiettivo di esplorare potenziali approcci terapeutici per FHM3, il composto GS967, bloccante della corrente tardiva del Na, è stato somministrato alle colture provenienti dai tre genotipi dei topi modello di FHM3 (WT, mutante eterozigote, mutante omozigote) ed è stata valutato il suo effetto sull'attività delle reti neuronali formatesi.

Complessivamente i risultati della nostra ricerca indicano che le colture in vitro mantengono senz'altro alcune importanti proprietà neurofisiologiche osservate nei ceppi di topo modello di FHM3 e possono quindi a loro volta costituire un buon modello della malattia FHM3. Inoltre, nonostante i limiti sopra elencati, l'uso di colture dissociate può costituire anche un metodo alternativo finalizzato a ridurre il numero degli animali utilizzati negli studi sperimentali.

Disease Name:

Familial Hemiplegic Migraine type 3

Nome malattia:

Emicrania Emiplegica familiare tipo 3

Project number:

GGP17178

33. CORRECTING FOXG1 ACTIVITY LEVELS BY SMALL RNA-ANALOGS MODULATING THE CORRESPONDING MRNA LEVELS AND THEIR TRANSLATION RATES

Rigoldi L., Liuzzi G., Frisari S., Maftai E.S., Ayub M., Mallamaci A.*

SISSA ~ Trieste ~ Italy

FOXG1 masters telencephalic development, exerting a pleiotropic control on its histogenesis and function (1). FOXG1 mutations, both copy number variations and structural mutations, may lead to abnormal activity levels of the corresponding protein product, resulting in complex neuropathological scenarios, collectively referred to as FOXG1 syndrome (2,3). No cure is presently available for such syndrome. To fix this issue, reliable procedures for functional profiling of novel neuropathogenic mutations and precision tools for therapeutic correction of FOXG1 activity levels are both urgently needed. We have recently developed a standardized platform for fast multidimensional profiling of novel FOXG1 mutations (4). Moreover, we have selected two genetically-encoded, small-RNAs able to gently modulate Foxg1-mRNA levels, upwards and downwards, in murine and human neural cells, while complying with endogenous gene tuning (5,6). Now we intend to develop chemically-synthesized analogs of these effectors, suitable for enduring in vivo CNS correction of FOXG1 activity levels, upon intrathecal and/or intravenous administration. We want to assess the impact of these effectors on neuronal activity, their target selectivity, and their neuro-toxicity. Moreover, in light of natural multi-level FOXG1 regulation by neuronal activity (7-10), we further intend to distribute correction of its expression among distinct levels, from transcription to translation, so leaving sufficient "residual room" for endogenous gene tuning at each level and lowering off-targeting risks originating from heavier intervention at a unique level. We have already selected some small-RNA analogs dampening FOXG1 translation (11). Now, leveraging a conserved u-orf, we plan to run a new screening, aimed at selecting small RNA analogs increasing FOXG1 translation gain.

Correzione dei livelli di attività di FOXG1 tramite piccoli analoghi di RNA capaci di modulare i corrispondenti livelli di mRNA ed i relativi tassi di traduzione.

FOXG1 guida lo sviluppo del cervello anteriore e ne influenza profondamente il funzionamento. Mutazioni a carico di tale gene possono causare livelli anomali di attività da parte della corrispondente proteina, portando a complessi quadri neuropatologici indicati collettivamente come sindrome di FOXG1. Al momento tale sindrome è incurabile. Per uscire da tale impasse, sono urgentemente necessarie procedure per la rapida caratterizzazione funzionale di nuove mutazioni, nonché strumenti di precisione per la correzione dei livelli di attività di FOXG1. In proposito, abbiamo recentemente sviluppato una piattaforma standardizzata per la profilazione funzionale di nuove mutazioni a carico di FOXG1. In più abbiamo selezionato due piccoli RNA codificati da geni artificiali, capaci di correggere i livelli di RNA messaggero prodotto dal gene FOXG1, in cellule neurali di topo e uomo, nel rispetto della regolazione naturale del gene. Ora intendiamo sviluppare analoghi chimicamente sintetizzati di tali RNA, capaci di assicurare una persistente correzione dei livelli di attività di FOXG1 nel sistema nervoso centrale, previa somministrazione per puntura spinale o infusione endovenosa. Vogliamo verificare l'effetto di tali farmaci sulla attività delle cellule nervose, la loro specificità e la loro neuro-tossicità. Inoltre, nota la regolazione naturale multilivello del gene FOXG1, intendiamo distribuire la correzione della sua espressione su livelli diversi, dalla trascrizione (sintesi dell'mRNA guidata dal gene) alla traduzione (sintesi della proteina guidata dall'mRNA), in modo da lasciare abbastanza "spazio residuo" per la regolazione naturale di FOXG1 a ciascun livello e limitare i rischi di perturbare aspecificamente altri geni con una manipolazione unica troppo "pesante".

Disease Name:

FOXG1 Syndrome

Nome malattia:

Sindrome da mutazione a carico di FOXG1

Project number:

GMR22T2018

34. GLUT1 DEFICIENCY: NEW THERAPEUTIC STRATEGIES TO INCREASE GLUCOSE TRANSPORT ACROSS THE BLOOD BRAIN BARRIER (BBB)

Cappato S.*^[1], Castagnola V.^[3], Bocciardi R.^[2], Baldassari S.^[1], Scudieri P.^[2], Musante I.^[1], Benfenati F.^[4], Zara F.^[2]

^[1]IRCCS Institute G. Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[2]Università degli Studi di Genova ~ Genova ~ Italy, ^[3]Valentina Castagnola, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino ~ Genova ~ Italy, ^[4]Italian Institute of Technology ~ Genova ~ Italy

SLC2A1 gene (OMIM138140) encodes the glucose transporter type 1 (Glut1), the unique mediator of glucose uptake in the endothelial cells of the Brain-Blood-Barrier (BBB). Most of the identified variants in SLC2A1 gene cause Glut1 loss-of-function and haploinsufficiency, resulting in the Glut1-deficiency Syndrome (GLUT1DS, OMIM606777), a complex neurologic disorder [1-5]. Although the ketogenic diet is usually effective [6], alternative therapeutic strategies are strongly desirable.

In this project, we aim at enhancing the glucose transport into the brain by developing two complementary approaches: (i) upregulating the transcription of wild-type Glut1 by modulating its expression at post-transcriptional level to rescue haploinsufficiency; (ii) increasing in a transient and regulated fashion the permeability of BBB to the paracellular diffusion of glucose by

developing inhibitory peptides for Claudin-5 (Cldn5), the main component of the BBB tight junctions (TJs).

(i) In silico analysis of the genomic region of SLC2A1 reveals the presence of a natural antisense transcript (SLC2A1-AS1) in a head-to-head divergent orientation, detectable in the different cellular models tested. To investigate its role on SLC2A1 expression, we setup a silencing approach based on the use of specific siRNAs. The 3'Untranslated Region (3'UTR) is also a critical element for mRNA stability, the SLC2A1 3'UTR is well conserved and different consensus sites for microRNA are predicted. We developed tools to investigate the role of 3'UTR in the post-transcriptional regulation of SLC2A1 expression. The results obtained in such heterologous systems will be tested in 2D models of BBB derived from controls and patients' iPSC.

(ii) The BBB permeability is regulated by specific TJ-forming proteins, specifically expressed by brain endothelial cells and making paracellular spaces toward the brain impermeable to water and solutes. Among different TJ proteins, Claudins (Cldns) are the mainly responsible for paracellular selectivity, with Cldn5 representing the main player in brain endothelial cells [7,8]. We devoted our efforts to study molecular approaches based on the use of competing peptides to modulate Cldn5 complexes and promoting a transient increase of paracellular permeability. Two families of peptides were investigated: peptides based on variants of the non-toxic C-terminal domain of Clostridium Perfringens enterotoxin (cCPE)[9,10] and peptidomimetics based on the first extracellular loop (ECL1) of Cldn5 (C5C2)[11]. Starting from the existing cCPE and C5C2 sequences, we set up an in silico platform¹² for the design of a library of short peptides (<20 aa) for Cldn5 binding modulation. We are screening these peptides and verifying effective binding to the Cldn5 complex and TJs opening in vitro using 2D (Transwells) and 3D (organoids)¹³ models of the BBB and complementary biochemical, imaging and electrophysiological approaches.

SINDROME DA DEFICIT DI GLUT1: NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE PER AUMENTARE IL TRASPORTO DI GLUCOSIO ATTRAVERSO LA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA.

Il gene SLC2A1 codifica per il trasportatore del glucosio di tipo 1 (Glut1), l'unico responsabile del passaggio di glucosio nelle cellule endoteliali della barriera emato-encefalica (BBB). Le varianti identificate nel gene SLC2A1 causano la perdita di funzione di Glut1 e aploinsufficienza, con conseguente sindrome da deficit di Glut1 (GLUT1DS), una patologia neurologica complessa. Sebbene la dieta chetogenica sia generalmente efficace, è auspicabile lo sviluppo di strategie terapeutiche alternative.

In questo progetto, miriamo a migliorare il trasporto di glucosio nel cervello con due approcci complementari: (i) aumentare la trascrizione di Glut1 mediante la modulazione della sua espressione a livello post-trascrizionale per correggere l'aploinsufficienza; (ii) aumentare la permeabilità della BBB favorendo la diffusione paracellulare di glucosio sviluppando peptidi inibitori per la Claudina-5 (Cldn5), il componente principale delle giunzioni strette, (Tight Junctions, TJ) nella BBB.

(i) L'analisi in silico e nostri saggi molecolari hanno rilevato la presenza di un trascritto antisense (SLC2A1-AS1) orientato in modo opposto, in diverse linee cellulari. Per studiare il suo ruolo sull'espressione di SLC2A1, abbiamo disegnato un approccio di silenziamento basato sull'uso di specifici siRNA. La regione 3'UTR è un altro elemento critico nella stabilità dell'mRNA, il 3'UTR di SLC2A1 è ben conservato e sono predetti siti di consenso per miRNA. Stiamo inoltre studiando il 3'UTR di SLC2A1 per consentire la modulazione dell'espressione di SLC2A1 attraverso piccole molecole di RNA (miRNA). I risultati ottenuti nei sistemi eterologhi saranno testati nei modelli 2D di BBB, ottenuti da cellule staminali pluripotenti indotte derivate da controlli e pazienti.

(ii) La BBB è regolata dalle TJ, strutture presenti sulle cellule endoteliali che compongono le pareti dei capillari cerebrali. La Claudina 5 (Cldn5), è la principale responsabile della permeabilità paracellulare verso il cervello. I nostri sforzi sono dedicati allo studio di approcci molecolari basati sull'uso di peptidi che siano in grado di regolare l'interazione tra le Cldn5 nelle TJ per permettere il

transitorio passaggio di glucosio nel cervello. Sono state studiate due famiglie di peptidi: mutazioni di peptidi basati sul dominio C-terminale dell'enterotossina di Clostr. Perfr. (cCPE) e peptidomimetici disegnati sulla base del primo dominio extracellulare della Cldn5 (C5C2). Partendo dalle sequenze di cCPE e C5C2, abbiamo creato una piattaforma in silico¹² per generare una libreria di brevi peptidi volti alla modulazione del legame delle Cldn5. Stiamo studiando la funzione di questi peptidi in modelli in vitro di BBB, 2D (Transwell) e 3D (organoidi)¹³, utilizzando approcci sperimentali complementari di biochimica, imaging ed elettrofisiologia.

Disease Name:

Glut1 deficiency Syndrome

Nome malattia:

Sindrome da deficit di Glut1

Project number:

GSA22A002

35. LEADING GLUT1 TOWARDS THE PLASMA MEMBRANE

Petrosino S., Gentile D., Esposito M., Grumati P.*

TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy

Glucose is an essential source of energy for brain. Glucose Transporter Type 1 (GLUT1) is the exclusive gateway to transport glucose across the blood-brain barrier. GLUT1 is primarily expressed in endothelial cells which form the blood-brain barrier. Therefore, a deficiency in GLUT1 results in catastrophic consequences for brain development and functions. GLUT1 deficiency syndrome is an incapacitating genetic disorder often presenting during infancy. This neurodevelopmental disease is characterized by infantile-onset epilepsy, impaired neurological growth and development, and complex movement disorders. The disease stems from heterozygous mutations in the SLC2A1 gene, which encodes GLUT1 protein, and it has no known cure. Typically, GLUT1 resides in tubule-vesicular endosomes and migrates to the plasma membrane in response to glucose withdrawal, which is instrumental to maintaining cellular glucose homeostasis. The correct GLUT1 trafficking from endosomes to plasma membrane requires a proper cellular autophagy flux and an intact biochemical structure of the protein. Indeed, GLUT1 interacts with several components on the autophagy machinery, that are functional, not only for lysosomal delivery, but also for the general GLUT1 trafficking. Moreover, GLUT1 translocation towards the cellular surface is finely regulated by its PDZ domain and by the phosphorylation state of specific residues, like Ser226. However, the molecular mechanisms responsible for GLUT1 trafficking are still not well understood; therefore, they are barely considered as potential therapeutically targets. This renewal aims to screen a library of approved autophagy modulator drugs that could positively impact on GLUT1 trafficking and potentially been employed as a new therapeutic tool. Moreover, we will employ a proteomic approach to identify other post-translational-modifications and regulatory elements to characterize them as putative targets for the treatment of GLUT1 deficiency.

Il glucosio è una fonte essenziale di energia per il cervello. Il trasportatore del glucosio di tipo 1 (GLUT1) è la porta d'ingresso del glucosio attraverso la barriera emato-encefalica. GLUT1 è espresso principalmente nelle cellule endoteliali che formano la barriera emato-encefalica. Pertanto, una carenza di GLUT1 provoca conseguenze catastrofiche per lo sviluppo e le funzioni cerebrali. La sindrome da deficit di GLUT1 è una malattia genetica invalidante che spesso si

presenta durante l'infanzia. Questa malattia del neuro sviluppo è caratterizzata da epilessia ad esordio infantile, crescita e sviluppo neurologici compromessi e disturbi del movimento. La patologia deriva da mutazioni eterozigoti nel gene SLC2A1, che codifica per la proteina GLUT1, e non ha una cura nota. Tipicamente, GLUT1 risiede negli endosomi tubulo-vescicolari e migra verso la membrana plasmatica in risposta alla necessità, delle cellule, di importare glucosio. Il corretto traffico di GLUT1 dagli endosomi alla membrana plasmatica richiede un adeguato flusso dell'autofagia cellulare e una struttura biochimica intatta della proteina GLUT1. Infatti, GLUT1 interagisce con diversi componenti del macchinario autofagico, che sono funzionali per il traffico generale di GLUT1. Inoltre, la traslocazione di GLUT1 verso la superficie cellulare è finemente regolata dal suo dominio PDZ e dallo stato di fosforilazione di residui specifici, come Ser226. Tuttavia, i meccanismi molecolari responsabili del traffico di GLUT1 non sono ancora ben compresi; pertanto, sono poco considerati come potenziali bersagli terapeutici. Questo progetto mira ad esaminare una libreria di farmaci, che modulano l'autofagia, che potrebbero avere un impatto positivo sul traffico di GLUT1 e potenzialmente essere impiegati come nuovo strumento terapeutico. Inoltre, utilizzeremo un approccio proteomico per identificare altre modificazioni post-traduzionali ed elementi regolatori per utilizzarli come bersagli per il trattamento del deficit di GLUT1.

Disease Name:

GLUT1 Deficiency Syndrome

Nome malattia:

Sindrome da deficit di GLUT1

Project number:

TGM22CBDM13

36. THERAPEUTIC EFFICACY OF MIR-181A/B DOWN REGULATION IN LEIGH SYNDROME

Pezzella N., Tammaro R., Ferrante L., Massaro F., Indrieri A., Franco B.*

TIGEM, TELETHON INSTITUTE OF GENETIC AND MEDICINE ~ POZZUOLI, NAPLES ~ Italy

Our laboratory has a long-standing interest in the study of cilia associated disorders with a special emphasis on those displaying renal cystic disease. Clinical variability is often observed in genetic diseases and one of the leading themes in the next 10 years of medical genetics research will be to understand the molecular bases of this variability to improve the management, genetic counseling and possibly treatment of these patients. OFD type I is a rare inherited form of renal cystic disease and mutations in HNF-1 β are associated with a variety of renal phenotypes. Patients belonging to both groups display a high degree of clinical variability. We have selected few mutations representative of the different phenotypes observed in the two groups of patients. We are currently characterizing these mutations by applying OMICS approaches to identify a) transcripts differentially expressed between wild-type and mutated forms of the proteins or b) proteins interacting only with the mutated or the wild-type proteins or vice versa. The results obtained will undergo bioinformatic analysis and the results will be used to formulate experimental hypotheses that will then be validated in the available animal models and patient's samples.

A different line of research, in collaboration with Alessia Indrieri, is focused on mitochondrial diseases (LHON and Leigh syndrome (LS)). Biochemical and genetic heterogeneity of LS has so far prevented the development of effective treatments. Gene/mutation-independent strategies would thus represent the ideal approach for LS. We proposed that a synergic and fine-tuned

modulation of pathways acting on mitochondria may ensure a more effective neuroprotective effect in mitochondrial disorders. We demonstrated that miR-181a and miR-181b (miR-181a/b) regulate key genes involved in mitochondrial biogenesis and function. NDUFS4 encodes an MRC subunit whose mutations are responsible for one of the most severe forms of LS. Mice with *Ndufs4* inactivation develop a severe encephalopathy resembling LS and resulting in death before post-natal day 60. We tested the effect of miR-181a/b modulation in *Ndufs4* animals. Our results show that inactivation of miR181a/b in *Ndufs4*KO mice results in a) increased survival rate as shown by Kaplan-Meier analysis, b) improved locomotor activity analyzed by behavioral studies and c) increased Oxygen Consumption Rate highlighted by biochemical analysis. We propose that miR-181a/b may represent novel gene-independent therapeutic targets not only for LS but also for a wide-range of neurodegenerative disorders caused by mitochondrial dysfunction.

Malattie genetiche rare dovute a disfunzione ciliare e mitocondriale studiate al TIGEM

Da anni il nostro laboratorio studia rare malattie genetiche associate a disfunzione di un piccolo organello cellulare, il ciglio primario, una specie di antenna con la quale la cellula "sente" l'ambiente cellulare per poi trasmettere segnali necessari per il funzionamento cellulare. Tra le diverse malattie associate a questa condizione ci occupiamo di quelle caratterizzate da rene policistico cercando di capire perché' gli individui con variazioni di sequenza in geni importanti per la funzione di questo organello mostrano aspetti clinici tanto diversi. Speriamo in questo modo di avere informazioni che possano indirizzare le scelte terapeutiche. Inoltre, in collaborazione con altri gruppi del TIGEM stiamo studiando l'effetto terapeutico della modulazione di un piccolo RNA sulle malattie con disfunzione mitocondriale ed in particolare nella Leber Hereditary optic neuropathy (malattia di LHON) e nella malattia di Leigh.

Disease Name:

Leigh Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Leigh

Project number:

TGM22CBDM01

37. A REDOX CYCLER-BASED THERAPEUTIC STRATEGY AGAINST MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN DYSFUNCTION-LINKED DISEASES

Bonesso D.^[1], Mattarei A.^[1], Donadon M.^[1], Favero M.^[1], Biasutto L.^[3], Rossa A.^[1], Peruzzo R.^[1], Corrà S.^[1], Brischigliaro M.^[1], Costa R.^[1], Zoratti M.^[3], Zeviani M.^[2], Viscomi C.^[1], Szabo I.*^[1]

^[1]University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]Burlo Garofalo Pediatric Hospital ~ Trieste ~ Italy, ^[3]CNR Institute of Neuroscience ~ Padova ~ Italy

Mitochondrial diseases result from a decreased oxidative phosphorylation (OXPHOS) that leads to a broad spectrum of incurable pathologies. Our goal was to understand whether membrane-permeant small molecule(s) with specific characteristics can be exploited to treat OXPHOS-related diseases. Therefore, we selected some molecules for their ability to replace the redox functions of complex III and among them identified pyocyanin as a promising agent. Pyocyanin is a bacterial redox cycler that can shuttle electrons from reduced coenzyme Q to cytochrome c, acting as an electron shunt. Sub- μ M dose of pyocyanin is harmless, restores respiration and increases ATP production in *Ttc19*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts as well as in fibroblasts from patients harboring pathogenic mutations in three different assembly/stabilization factors of complex III (namely,

TTC19, BCS1L and LYRM7). The drug was able to normalize the mitochondrial membrane potential, mildly increased ROS production, and triggered mitochondrial biogenesis. These in vitro effects were confirmed also in vivo, in both *Drosophila melanogaster* TTC19KO and in *Danio rerio* TTC19KD.

Here we show that pyocyanin and its newly synthesized derivative with enhanced life-time and improved tissue distribution exhibited a benefit in Ttc19 KO mouse model as well. Administration of low, non-toxic concentration of pyocyanin significantly ameliorated movement and coordination proficiency, without inducing toxicity. Likewise, pyocyanin, able to receive electrons from NADH, showed a beneficial effect also in the case of cells and mice with complex I disease. Our results point to exploitation of redox cyclers for therapy against diseases due to OXPHOS dysfunction.

UNA STRATEGIA BASATA SU PICCOLE MOLECOLE CONTRO MALATTIE MITOCONDRIALI

I mitocondri sono piccoli organelli che rappresentano le centrali energetiche delle cellule, in quanto permettono la produzione di ATP, utilizzando l'energia dei nutrienti introdotti nell'organismo. L'ATP, una specie di "moneta" energetica, è fondamentale per svolgere numerose funzioni delle cellule. L'ATP viene prodotta grazie al passaggio di elettroni provenienti dai nutrienti attraverso complessi proteici che si trovano nella membrana dei mitocondri e sono responsabili per la cosiddetta respirazione cellulare. Le malattie mitocondriali derivano da una diminuzione della respirazione cellulare nei mitocondri, che porta a un ampio spettro di patologie incurabili. Il nostro obiettivo era capire se alcune piccole molecole permeabili alla membrana possono essere sfruttate per trattare le malattie legate al malfunzionamento mitocondriale. Pertanto, abbiamo selezionato alcune molecole per la loro capacità di sostituire le funzioni nel permettere il passaggio di elettroni del complesso proteico chiamato complesso III coinvolto nella respirazione mitocondriale, e tra queste abbiamo identificato la piocianina come un agente promettente. La piocianina è in grado di trasportare gli elettroni fra vari componenti della catena respiratoria, ripristinando così questo processo fondamentale per la produzione dell'ATP. La dose molto bassa di piocianina è innocua, ripristina la respirazione e aumenta la produzione di ATP nei fibroblasti di pazienti che presentano mutazioni patogene in tre diversi fattori di assemblaggio/stabilizzazione dei complessi della catena respiratoria, e di conseguenza hanno complessi proteici disfunzionali. Gli effetti benefici della piocianina sono stati confermati anche su modelli animali di mosca della frutta e in pesci. Inoltre, dimostriamo che la piocianina e il suo derivato di nuova sintesi, con una maggiore durata di vita e distribuzione tissutale migliorata, hanno mostrato un beneficio anche nel modello murino di malattie mitocondriali. In tutti questi modelli infatti, la somministrazione di basse concentrazioni non tossiche di piocianina ha migliorato significativamente la capacità di movimento e coordinamento, senza indurre tossicità. I nostri risultati indicano lo sfruttamento di una classe di molecole per la terapia contro le malattie dovute a disfunzioni della catena respiratoria.

Disease Name:

Mitochondrial diseases

Nome malattia:

Malattie mitocondriali

Project number:

GGP19118

38. MITMED: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEW DISEASE GENES FOR MITOCHONDRIAL DISORDERS

Volta S., Brischigliaro M., Fernandez--Vizarra E., Salviati L., Zeviani M., Viscomi C.*

University of Padova ~ Padova ~ Italy

MitMed aims at expanding our knowledge and understanding of mitochondrial diseases by identifying new disease-genes and characterizing their functional and pathogenetic role. By using a diagnostic panel covering over 500 genes, we identified in our cohort 7 patients with mutations in mtDNA, including four heteroplasmic point mutations and three large deletions. In addition, we identified several mutations in nuclear genes (1), including some encoding for proteins related to (i) mtDNA maintenance and expression (RRM2B, C10ORF2 (TWNK), POLG, TK2, GFM1, RARS2, IARS2), (ii) coenzyme Q biosynthesis (PDSS2, COQ4), (iii) respiratory complexes subunits and assembly factors (NDUFB9 and SURF1), other proteins (OPA1, ETHE1). Overall, about 45% of our pediatric patients had a diagnosis. However, the clinical exomes did not identify any new disease genes.

We focused on previously identified genes, in particular, APOPT1/COA8 and APOO. COA8 was previously identified as responsible for a cavitating leukoencephalopathy in patients with complex IV defects (2,3). By studying human cellular and *Drosophila melanogaster* models of COA8 deficiency (4), we are defining the specific role for COA8 in cytochrome c oxidase biogenesis (refer to poster from project GJC21014 for details).

Mutations in APOO cause an X-linked recessive mitochondrial myopathy with lactic acidosis, cognitive impairment and autistic features (5). APOO encodes for MIC26, a component of the mitochondrial contact site and cristae organizing system complex (MICOS), which plays key roles in controlling cristae junctions. The mutation caused impaired processing of the protein during import and faulty insertion into the IMM. The complete loss of Mic26 in *D. melanogaster* causes partial developmental lethality due to altered mitochondrial ultrastructure and multiple respiratory chain deficiencies caused by disassembly of MICOS complex. A transgenic fly model expressing an Mic26-HA under a strong driver resulted in a complete developmental lethality, while a more moderate driver does not result in lethality. We crossed the Mic26 knockout flies with flies overexpressing Opa1 and other components of the MICOS complex, and we are currently investigating their phenotype.

MitMed: identificazione e caratterizzazione di nuovi geni malattia per i disturbi mitocondriali

MitMed mira ad ampliare la nostra conoscenza delle malattie mitocondriali identificando nuovi geni-malattia e caratterizzando il loro ruolo funzionale, in modo da comprendere come queste patologie si sviluppano. Utilizzando un pannello diagnostico con oltre 500 geni, abbiamo identificato nella nostra coorte sette pazienti con mutazioni nel mtDNA, incluse quattro mutazioni puntiformi eteroplasmiche e tre ampie delezioni. Inoltre, abbiamo identificato diverse mutazioni nei geni nucleari, tra cui alcune codificanti per proteine correlate a (i) mantenimento ed espressione del mtDNA (RRM2B, C10ORF2 (TWNK), POLG, TK2, GFM1, RARS2, IARS2), (ii) biosintesi del coenzima Q (PDSS2, COQ4), (iii) subunità dei complessi respiratori e fattori di assemblaggio (NDUFB9, SURF1), altre proteine (OPA1, ETHE1). Finora non abbiamo trovato nuovi geni-malattia.

Ci siamo pertanto concentrati su geni precedentemente identificati, in particolare APOPT1/COA8 e APOO. Mutazioni in COA8 sono state precedentemente trovate in pazienti con leucoencefalopatia cavitante associata a deficit di complesso IV della catena respiratoria (citocromo c ossidasi, cox).

Studiando modelli cellulari umani e di *Drosophila melanogaster* deleti in COA8, abbiamo definito il ruolo per questa proteina nella biogenesi della cox (fare riferimento al poster del progetto GJC21014 per i dettagli).

Le mutazioni in APOO causano una miopia mitocondriale recessiva legata all'X con acidosi lattica, deterioramento cognitivo e caratteristiche autistiche. APOO codifica per MIC26, un componente del sito di contatto mitocondriale e del complesso del sistema di organizzazione delle creste (MICOS), che svolge un ruolo chiave nel controllo delle giunzioni delle creste. La mutazione causa difetto di import della proteina nei mitocondri e suo inserimento errato nella membrana mitocondriale interna. L' assenza di MIC26 in *D. melanogaster* provoca una profonda alterazione dell'ultrastruttura mitocondriale e un deficit multiplo di catena respiratoria. Inoltre, anche un'elevata sovraespressione della proteina interferisce con il normale sviluppo della mosca una letalità dello sviluppo completa, mentre una sovraespressione moderata è compatibile con un normale sviluppo. Recentemente abbiamo incrociato le mosche knockout Mic26 con mosche che sovraesprimono Opa1 e altri componenti del complesso MICOS e attualmente stiamo studiando il loro fenotipo.

Disease Name:

Mitochondrial diseases

Nome malattia:

Malattie mitocondriali

Project number:

GGP20013

39. AAV-MEDIATED INHIBITION OF MIR-181A/B AS GENE-INDEPENDENT THERAPEUTIC TOOL FOR MITOCHONDRIAL DISEASES

Volpe M.^[1], Massa F.^[1], Barbato S.^[1], Tammaro R.^[1], De Risi M.^[1], Saurino R.^[1], Molinari M.^[1], Banfi S.^[1], Carrella S.^[2], Surace E.M.^[3], De Leonibus E.^[1], Franco B.^[1], Indrieri A.*^[1]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy, ^[2]Stazione Zoologica Anton Dohrn ~ Napoli ~ Italy,

^[3]Department of Translational Medicine, Federico II University ~ Napoli ~ Italy

Mitochondrial Diseases (MDs) are a group of inherited disorders caused by defective oxidative phosphorylation. They show a wide range of clinical phenotypes and extreme genetic heterogeneity that makes the development of efficient treatments particularly difficult. Gene/mutation-independent approaches acting downstream of the genetic defect are thus highly desirable. microRNAs represent a promising therapeutic tool due to their capability to simultaneously regulate different pathways. We recently demonstrated that genetic inactivation of miR-181a and b (miR-181a/b) exerts a protective action on different MDs models associated with neuronal degeneration through the enhancement of mitochondrial turnover.

To test if miR-181a/b downregulation may be exploited as a therapeutic strategy in MDs we generated an Adeno Associated Viral (AAV) vector expressing a miRNA sponge able to specifically bind miR-181a/b and inhibit their activity. The miR-181a/b sponge was first tested in the *Ndufs4* KO mouse, a murine model of both Leber Hereditary Optic Neuropathy and Leigh syndrome, two of the most frequent MDs affecting the eye and the brain, respectively. Interestingly mice treated with the miR-181a/b sponge show increased mitochondrial turnover and a significant amelioration of the visual function and of the locomotor activity. Moreover, our data also show an excellent safety profile of the sponge therapy in the mouse retina. Finally, we also analyze the effect of miR-181a/b-sponge in OPA1-deficient SHSY5Y cells, a cellular model of Dominant Optic Atrophy, the second most common mitochondrial optic neuropathy. Our result indicates the miR-181a/b-sponge

increases mitochondrial biogenesis, and ameliorates mitochondrial fragmentation leading to decreased apoptosis. These findings demonstrate the therapeutic efficacy of the miR-181a/b-sponge, highlighting its efficacy as a potential new gene-independent therapeutic strategy for MDs, and unveiling the possibility to translate it in clinics.

Le malattie mitocondriali sono malattie genetiche ereditarie causate dalla disfunzione dei mitocondri e sono caratterizzate da sintomi estremamente variabili a carico di diversi organi, e da decorso clinico incerto. Esse sono il risultato di mutazioni riscontrate in diverse porzioni del nostro DNA. Sfortunatamente, una terapia per queste malattie non è ancora disponibile e ci vorranno molti anni nel caso in cui l'approccio miri ad affrontare un singolo segmento o porzione di DNA alla volta. Recentemente abbiamo identificato due piccoli acidi ribonucleici (RNA) non codificanti, chiamati microRNA, che sono normalmente presenti nelle cellule neuronali e abbiamo scoperto che la loro inibizione è in grado di proteggere i neuroni dalla morte che si verifica a causa della disfunzione mitocondriale. Abbiamo quindi ingegnerizzato un virus rendendolo capace di portare nei neuroni una molecola capace di inibire l'azione di questi microRNA e abbiamo dimostrato che questa strategia terapeutica è in grado di prevenire e di migliorare il decorso di diverse malattie mitocondriali indipendentemente dal tipo di mutazione che causa la malattia stessa.

I nostri dati indicano quindi che l'inibizione di questi microRNA possa costituire una strategia terapeutica in grado, in linea di principio, di essere applicata con successo a diverse malattie mitocondriali ed ad altre condizioni cliniche associate alla disfunzione mitocondriale.

Disease Name:

Mitochondrial Diseases

Nome malattia:

Malattie mitocondriali

Project number:

TGM22MT01

40. IDENTIFICATION OF DRUGS TARGETING POLG DISORDERS BY YEAST/ZEBRAFISH PRE-SCREENING

Brañas Casas R.^{*[1]}, Gilea A.I.^[2], Facchinello N.^[3], Celegghin R.^[1], Risato G.^[1], Ravarotto S.^[1], Fiore E.^[1], Dalla Valle L.^[1], Lodi T.^[2], Tiso N.^[1], Baruffini E.^[2], Argenton F.^[1]

^[1]University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]University of Parma ~ Parma ~ Italy, ^[3]Italian National Research Council (CNR) ~ Padova ~ Italy

Introduction: 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 loci cause at least six mitochondrial diseases with Mendelian inheritance, collectively named POLG-related disorders, characterized by multi-organ dysfunction, mtDNA depletion and/or accumulation of multiple deletions. The therapeutic treatment of POLG diseases is currently limited to symptom management.

Aim and Strategy: To identify new drugs with therapeutic effects on POLG disorders, we have adopted a multi-species approach, based on drug pre-screen in Polg-mutated yeast (mip1), followed by drug validation in zebrafish Polg and Polg2 mutants, specifically generated and characterized during this project.

Results: The screen of drugs in yeast has been performed by evaluating the rescue of respiratory

growth due to mtDNA instability ("petite" phenotype) in a thermosensitive mip1 mutant. More in-depth analysis included quantitative evaluation of respiratory activity, mtDNA levels, Mip1 expression, mitophagy and dNTPs levels. The screen succeeded in identifying approximately 20 drugs able to rescue at least two of these phenotypes: three drugs are promising, being able to increase the mtDNA levels, the Mip1 expression and the respiratory activity.

After proving that one of the molecules found in a previous screening, Clofilium tosylate (CLO), could rescue POLG phenotypes in multiple systems, including yeast, worm, human fibroblasts and zebrafish Polg mutants, we tested the molecule in a zebrafish Polg2 KO line. Interestingly, the treatment with CLO could rescue mtDNA levels and motor performances in Polg2 mutant animals, demonstrating that CLO is effective also under accessory subunit (Polg2) deficiency. This result suggests a wider range of CLO applicability within the spectrum of genetically heterogeneous POLG disorders.

Other candidate drugs are now under analysis. Preliminary results indicate that another promising molecule is "MRS2", shown to rescue mtDNA levels in zebrafish Polg2 mutants. Further tests are required to prove its efficacy under both Polg and Polg2 deficiency, as well as its synergic activity in combination with CLO and other positive hits arising from the drug screen.

Titolo: Identificazione di farmaci bersaglianti le malattie POLG attraverso uno screening basato su lievito e zebrafish

Introduzione: Negli esseri umani esiste un organello che funge da centrale energetica per le cellule: il mitocondrio. Questo organello è dotato di un proprio patrimonio genetico: il DNA mitocondriale (mtDNA). Tale "mtDNA" viene prodotto e mantenuto integro dalla "DNA polimerasi mitocondriale", un macchinario proteico costituito dalle componenti "POLG" e "POLG2". Se i geni per queste proteine mutano, si hanno delle malattie "mitocondriali" ereditarie, dette "POLG", che colpiscono svariati organi nei pazienti. La terapia per le malattie POLG è al momento basata solo sulla gestione dei sintomi.

Scopo e strategia del progetto: per identificare nuovi farmaci efficaci nelle malattie POLG, abbiamo adottato una strategia "multi-specie", basata sul test di farmaci nel lievito "mip1", un fungo unicellulare mutante, che riproduce la malattia umana POLG su scala cellulare. I farmaci più promettenti vengono poi confermati in un modello animale semplificato, lo zebrafish o pesce zebra. Nel corso del progetto, infatti, sono stati prodotti degli zebrafish mutanti, di tipo "Polg" e Polg2", che riproducono in miniatura la malattia umana POLG. L'embrione di zebrafish è infatti millimetrico, mentre l'adulto misura circa 5 centimetri. Il saggio di farmaci è quindi enormemente facilitato da modelli di studio di così piccole dimensioni.

Risultati: il saggio di farmaci nel lievito ha permesso di identificare con successo circa 20 molecole candidate nella cura delle malattie POLG. Di queste, la molecola più promettente (CLO) è stata saggiata anche su un animale invertebrato (il verme "C. elegans"), su fibroblasti di pazienti POLG e su zebrafish Polg. In tutti i casi la molecola ha ripristinato una normale quantità di DNA mitocondriale, correggendo alcuni aspetti della malattia. Degno di nota, abbiamo verificato che CLO funziona anche negli zebrafish di tipo Polg2, correggendo sia la quantità di mtDNA che le funzioni motorie. Pertanto, CLO si dimostra un farmaco potenzialmente applicabile a diverse classi di pazienti (sia POLG che POLG2).

Le analisi sulle altre molecole candidate sono tuttora in corso. I risultati preliminari indicano che un'ulteriore molecola, "MRS2", è in grado di correggere la quantità di mtDNA negli zebrafish di tipo "Polg2". Si tratta ora di verificare la sua efficacia anche negli zebrafish di tipo Polg, oltre che l'eventuale effetto in combinazione con il farmaco CLO e con le altre molecole candidate, identificate nel corso di questo progetto.

Disease Name:

POLG mitochondrial disorders

Nome malattia:

Malattie mitocondriali POLG

Project number:

GGP19287

Genetic neurological disorder\Ataxias

41. REGULATION OF ALTERNATIVE SPLICING OF CA²⁺ CHANNELS BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING AS AN ALL-PURPOSE GENETIC THERAPY FOR LOSS-OF-FUNCTION CACNA1A MUTATIONS

Jaudon F.*^[1], Guida F.^[2], Musante I.^[2], Muzzi L.^[2], Ruggeri R.^[1], Scudieri P.^[2], Zara F.^[2], Cingolani L.^[1]

^[1]University of Trieste ~ Trieste ~ Italy, ^[2]IRCCS Istituto Giannina Gaslini ~ Genoa ~ Italy

In this project, we compensate for CACNA1A loss-of-function mutations, which underlie neurological disorders, such as episodic ataxia type 2 and absence epilepsy, by regulating the expression of splice variants of a related gene, CACNA1B. Our approach is effective in rescuing electrophysiological and behavioral abnormalities in human iPSC-induced neurons and Cacna1a-deficient mice.

A deficiency in CACNA1A, which encodes the P/Q-type calcium channel CaV2.1, up-regulates the expression of CACNA1B, encoding the related N-type calcium channel CaV2.2. Despite this compensation, the complex neurological profile of CaV2.1 loss-of-function mutations arises, partly because CaV2.2 is not as effective as CaV2.1 in supporting neuronal communication.

We have previously shown that a conserved splicing event, generating two major alternative variants for both CaV2.1 and CaV2.2, regulates the efficacy of both channel types. However, the brain levels of the more effective variant for neuronal communication (EFa) are high enough only for CaV2.1. We reasoned that CaV2.2 would compensate more effectively for CaV2.1 if we could increase the abundance of its EFa variant.

To this end, we have developed a CRISPR/Cas9-mediated genome editing strategy to selectively increase the neuronal abundance of the CaV2.2 EFa variant. Our approach is extremely effective in rescuing network excitability defects of human iPSC-induced neurons carrying CACNA1A loss-of-function mutations, and electrophysiological and behavioral abnormalities of CaV2.1-deficient mice.

Because we leverage a general up-regulation of CaV2.2, rather than targeting individual CaV2.1 mutations, our approach is designed to develop a gene therapy suitable for all CaV2.1 loss-of-function mutations.

Regolazione dello splicing alternativo dei canali calcio mediante editing del genoma come terapia genetica multiuso per le mutazioni CACNA1A con perdita di funzione

In questo progetto compensiamo le mutazioni con perdita di funzione del gene CACNA1A, che sono alla base di disturbi neurologici quali l'ataxia episodica di tipo 2 e l'epilessia con assenza, andando a regolare l'espressione delle varianti di splicing di un gene correlato, CACNA1B. Il nostro approccio è efficace nel correggere le anomalie elettrofisiologiche e comportamentali di neuroni indotti da cellule iPS umane e di topi con ridotta espressione di Cacna1a.

Una carenza di CACNA1A, che codifica per il canale del calcio CaV2.1 di tipo P/Q, aumenta l'espressione del gene correlato CACNA1B, che codifica per il canale del calcio CaV2.2 di tipo N. Nonostante questa compensazione, il complesso profilo neurologico delle mutazioni con perdita di funzione di CaV2.1 emerge, in parte perché CaV2.2 non è efficace quanto CaV2.1 nel supportare la comunicazione tra neuroni.

Abbiamo precedentemente dimostrato che un evento di splicing conservato, che genera due principali varianti alternative sia per CaV2.1 che per CaV2.2, regola l'efficacia di entrambi i tipi di canale. Tuttavia, i livelli cerebrali della variante più efficace per la comunicazione tra neuroni (EFa) sono sufficientemente alti solo per il canale CaV2.1. Abbiamo pensato che CaV2.2 potrebbe compensare più efficacemente per CaV2.1 se riuscissimo ad aumentare l'abbondanza della sua

variante EFa.

A tal fine, abbiamo sviluppato una strategia di editing del genoma mediata da CRISPR/Cas9 per aumentare selettivamente l'espressione neuronale della variante EFa di CaV2.2. Il nostro approccio è estremamente efficace nel correggere anomalie elettrofisiologiche e comportamentali di topi con ridotta espressione di CaV2.1 e difetti di eccitabilità di neuroni indotti da cellule iPS umane con mutazioni con perdita di funzione in CACNA1A.

Poiché sfruttiamo un aumento di espressione di CaV2.2, piuttosto che cercar di correggere singole mutazioni in CaV2.1, il nostro approccio si presta allo sviluppo di una terapia genica adatta a tutte le mutazioni con perdita di funzione di CaV2.1.

Disease Name:

Episodic ataxia type 2

Nome malattia:

Atassia episodica di tipo 2

Project number:

GGP19181

42. CELL-PENETRATING SIL1 PROTEIN REPLACEMENT THERAPY FOR MARINESCO-SJOGREN SYNDROME

Amodei L.*^[1], Ruggieri A.G.^[1], Potenza F.^[1], Dufrusine B.^[2], Sallese M.^[1]

^[1]G. D'Annunzio" University of Chieti-Pescara ~ Chieti ~ Italy, ^[2]Faculty of Bioscience and Technology for Food Agriculture and Environment, University of Teramo ~ Teramo ~ Italy

Marinesco-Sjogren's syndrome (MSS) is a rare autosomal recessive genetic disorder that occurs in early childhood. MSS is characterised by a clinical triad consisting of congenital cataracts, muscle weakness and ataxia resulting from myopathy and Purkinje cell degeneration. In most cases, MSS is due to loss-of-function mutations of SIL1, a nucleotide exchange factor for the key ER chaperone BiP (Binding Immunoglobulin Protein also known as GRP78). The loss of SIL1 functions by preventing the release of ADP from BiP, blocks the folding cycle and thus leads to the accumulation of unfolded proteins in the ER and the activation of the unfolded protein response (UPR). Indeed, a maladaptive UPR possibly contribute to Purkinje e skeletal muscle cell degeneration in MSS. We have recently shown that inhibition of the UPR signal transducer PERK reduces cell death and delays disease onset in the woozy mouse model of MSS. Unfortunately, the beneficial effects of PERK inhibition have diminished substantially over time.

In the current study we are evaluating a protein replacement strategy to rescue Sil1 functions. To this aim we prepared different fusion proteins with Sil1 fused to different cell penetrating peptides (CPP). The most efficient penetration was obtained by placing the transactivator of transcription (TAT) peptide of human immunodeficiency virus to the C-terminus of Sil1. Treatment of diseased cells with this recombinant fusion protein was able to improve some biomarkers of MSS. We are preparing a large quantity of recombinant Sil1-TAT to treat woozy mice in order to examine the pharmacokinetics and obtain information on a possible rescue of the MSS phenotype.

The conclusion of the study will provide information on the possible use of CPP-based protein replacement therapy for the treatment of MSS.

La sindrome di Marinesco-Sjögren (MSS) è una rara malattia genetica dell'infanzia legata a mutazioni del gene SIL1. Gli individui affetti da MSS soffrono di varie disabilità, tra cui debolezza

muscolare e perdita di coordinazione motoria causata dalla morte di particolari cellule neuronali del cervelletto. Dopo una fase iniziale progressiva i sintomi si stabilizzano e i pazienti hanno un'aspettativa di vita normale. Pertanto, qualsiasi trattamento che prevenga, ritardi o attenui la degenerazione cerebellare e/o la patologia muscolare può migliorare significativamente la qualità di vita dei pazienti.

Studi precedenti hanno riportato che la reintroduzione del gene SIL1 previene la degenerazione cerebellare e preserva la funzione motoria in topi, denominati wozy, portatori dello stesso difetto genetico rilevabile nelle persone affette da MSS. Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente dimostrato che agendo su un meccanismo cellulare denominato UPR (risposta a proteine malpiegate) possiamo ridurre la morte cellulare e ritardare l'insorgenza della malattia nel topo wozy. Purtroppo, gli effetti benefici dell'inibizione di UPR diminuiscono notevolmente nel tempo.

Nel presente studio stiamo valutando una strategia di sostituzione proteica per rimpiazzare le funzioni svolte da Sil1. A questo scopo abbiamo preparato diverse proteine di fusione tra Sil1 e peptidi capaci di penetrare nelle cellule. Queste proteine chimeriche dovrebbero entrare nelle cellule, grazie alla presenza dei peptidi penetranti, e sopperire alla funzione mancante. La chimera che entrava con maggiore efficienza nella cellule è stata ottenuta inserendo il peptide del transattivatore della trascrizione (TAT) del virus dell'immunodeficienza umana nella regione terminale di Sil1 (Sil1-TAT). Il trattamento delle cellule malate con questa proteina di fusione ricombinante è stato in grado di migliorare alcuni indicatori di malattia. Altri saggi sono in corso per capire a pieno gli effetti di questo trattamento. Inoltre, stiamo preparando una grande quantità della suddetta proteina di fusione (Sil1-TAT) da utilizzare per il trattamento di topi wozy al fine di esaminare la distribuzione del farmaco nei diversi tessuti ed ottenere informazioni su un possibile miglioramento delle capacità motorie.

La conclusione dello studio fornirà indicazioni sul possibile uso della terapia di sostituzione proteica per il trattamento della MSS.

Disease Name:

Marinesco-Sjögren syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Marinesco-Sjögren

Project number:

GGP20092

43. PRECLINICAL EFFICACY STUDY OF PERK SIGNALING INHIBITORS AND TUDCA IN MARINESCO-SJÖGREN SYNDROME

Lavigna G., Pasini C., Grasso A., Masone A., Mignogna L., Grande V., Restelli E., Fracasso C., Lucchetti J., Gobbi M., Chiesa R.*

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri ~ Milano ~ Italy

Marinesco-Sjögren syndrome (MSS) is a genetic disease of infancy linked to loss-of-function mutations in the gene encoding SIL1, a nucleotide exchange factor for the endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP (1). Individuals with MSS suffer various disabilities, including loss of motor coordination due to cerebellar degeneration, and skeletal muscle weakness. After a progressive phase, symptoms stabilize and patients live to old age. Therefore, any pharmacological treatment that delays or attenuates cerebellar degeneration and/or muscle pathology can significantly improve their quality of life. We found that inhibiting the PERK branch of the unfolded protein

response (UPR) with GSK2606414 delays Purkinje cell (PC) degeneration, and ameliorates motor function and muscle pathology in the woozy mouse model of MSS (2). However complete PERK inhibition by GSK2606414 is toxic to the pancreas and does not fully rescue the mouse disease. In this project, we tested trazodone and dibenzoylmethane (DBM), which partially inhibit PERK signaling downstream of eIF2alpha-P without pancreatic toxicity (3). We also tested tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a chemical chaperone which prevents ER stress-induced apoptosis in MSS cells (4). These drugs are already used in the clinical practice, therefore positive results in the woozy model may lead to their rapid repurposing for MSS.

Trazodone was given 40 mg/kg daily via intraperitoneal (ip) injection; DBM 0.5% and TUDCA 0.4% in the diet ad libitum. Controls were administered saline ip or normal diet. Mice were treated starting from the fifth week of age for five weeks. Motor function was scored weekly by the beam walking and accelerated rotarod tests. At the end of the treatment, half brain was fixed for CHOP and calbindin immunohistochemistry to assess the effect of the treatments on PERK/eIF2alpha signaling and PC degeneration. The other half was snap frozen for laser capture microdissection of PCs for qPCR analysis of UPR markers.

Trazodone did not prevent development of motor dysfunction in woozy mice, although it slightly ameliorated their performance in the beam walking test. However, immunohistochemistry found no reduction in CHOP activation or PC degeneration, indicating that the effect on motor behavior was not due to inhibition of PERK/eIF2alpha signaling. DBM and TUDCA had no effect on development or progression of motor deficits assessed by either the beam walking or the rotarod test. Analyses to test whether they had any effect on the UPR and PC degeneration are under way.

In conclusion, at the dosages tested, trazodone, DBM and TUDCA did not prevent disease in the woozy mouse model of MSS, with only trazodone improving motor coordination in the beam walking test through a mechanism unrelated to inhibition of PERK signaling in PCs. Further investigations are required to see whether the treatment schedule and/or drug dosage can be optimized to obtain robust target engagement and beneficial effects.

Studio preclinico di efficacia terapeutica degli inibitori di PERK e del TUDCA nella sindrome di Marinesco-Sjögren

La sindrome di Marinesco-Sjögren (MSS) è una rara malattia genetica dell'infanzia che causa grave disabilità, tra cui perdita della coordinazione motoria dovuta a degenerazione cerebellare e debolezza muscolare a causa della degenerazione dei muscoli scheletrici. Dopo una fase progressiva, i sintomi si stabilizzano e i pazienti hanno una normale aspettativa di vita. Pertanto, qualsiasi trattamento farmacologico che ritardi o attenui la degenerazione cerebellare e/o la patologia muscolare potrebbe migliorare significativamente la loro qualità di vita. Abbiamo scoperto che l'inibizione della chinasi PERK, un enzima che regola la sintesi delle proteine, con il farmaco sperimentale GSK2606414 ritarda la degenerazione cerebellare e migliora la funzione motoria e la patologia muscolare in un modello murino di MSS. Tuttavia il GSK2606414 è tossico per il pancreas e non previene completamente la malattia. Questo progetto si proponeva di valutare l'efficacia del farmaco antidepressivo trazodone e del dibenzoilmetano (DBM), un derivato della liquirizia dalle proprietà antitumorali, che inibendo parzialmente PERK non causano tossicità pancreatica. Ci si proponeva anche di studiare anche l'acido tauroursodeossicolico (TUDCA), un farmaco con un diverso meccanismo d'azione, che ha mostrato risultati positivi in un modello cellulare della malattia. Poiché questi farmaci sono già utilizzati nella pratica clinica per altri scopi, una dimostrazione di efficacia nel modello murino potrebbe portare rapidamente al loro utilizzo nei pazienti affetti da MSS.

Abbiamo effettuato una serie di esperimenti nei topi modello di MSS per verificare la capacità di questi farmaci di prevenire l'insorgenza dei deficit motori, o rallentarne la progressione, e proteggere dalla degenerazione del cervelletto. Il trazodone è stato somministrato tramite iniezione intraperitoneale alla dose di 40 mg/kg, mentre il DBM allo 0,4% e il TUDCA allo 0,5% nella dieta, a

partire dalla quinta settimana di vita, per una durata di 5 settimane. Per tutta la durata del trattamento abbiamo monitorato la progressione della disfunzione motoria con appositi test comportamentali. Questi test hanno evidenziato un modesto effetto protettivo del trazodone, ma non del DBM o del TUDCA. Sono in corso ulteriori analisi per capire se i farmaci hanno raggiunto le concentrazioni attese nel cervello e se hanno inibito sufficientemente PERK.

Disease Name:

Marinesco-Sjögren syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Marinesco-Sjögren

Project number:

GGP20071

44. AN UNEXPECTED ROLE OF THE NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME PROTEIN (NBS1) AT THE PRIMARY CILIUM AND IN HEDGEHOG SIGNALING IS IMPORTANT FOR CEREBELLAR DEVELOPMENT AND MEDULLOBLASTOMA

Fabretti F.^[2], Nicolis Di Robilant V.^[2], La Monica V.^[2], Augusto M.C.^[2], Battaglini D.^[2], Polonara F.^[2], Di Giulio S.^[2], Belardinilli F.^[2], Moretti M.^[1], Corsi A.^[2], De Panfilis S.^[3], Peruzzi G.^[3], De Smaele E.^[1], Petroni M.^[2], Giannini G.*^[2]

^[1]Dept. Experimental Medicine, University La Sapienza ~ Roma ~ Italy, ^[2]Dept. of Molecular Medicine, University La Sapienza ~ Roma ~ Italy, ^[3]Italian Institute of Technology ~ Roma ~ Italy

NBS1 is a member of the MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) complex, which is essential for DNA repair and the DNA Damage Response (DDR). Hypomorphic mutations in NBS1 cause the Nijmegen Breakage Syndrome, characterized by neurodevelopmental and immune system disorders plus cancer predisposition. Inherited or somatic NBS1 mutations occur in several tumors, including medulloblastoma (MB), a childhood neoplasia often connected to deregulation of the Sonic Hedgehog (SHH) pathway. We have shown that monoallelic inactivation of NBS1 in the CNS in mice sustains MB development in a constitutively active SHH background, via DNA damage related and unrelated pathways (Petroni et al., 2022). Surprisingly, complete NBS1 knockout impaired SHH-MB growth and led to hypoplastic cerebellum and defective SHH activity in both WT and SHH-activated backgrounds.

Given that: i) transduction of SHH signaling is strongly dependent on the Primary Cilium (PC), a signaling organelle extruding from the surface of mammalian cells and organized by the centrosome/basal body; ii) there is an emergent link between DDR and centrosome/PC proteins; we raised the hypothesis that NBS1 might have a yet undescribed and uncanonical role in the regulation of the SHH pathway via the PC. Indeed, we showed that NBS1 localizes at the base of the PC and its deficiency consistently leads to severe dysmorphisms of the ciliary structure. Specific NBS1 KO in cerebellar granule cell progenitors (GCPs, the cells of origin for SHH-MB) not only confirmed that NBS1 loss abrogates SHH-MB formation, but also led to an aberrant cerebellar cortical architecture, reflected in a reduced cerebellar size with impaired proliferation of GCPs, coupled with a severe alteration in SHH activity in vivo, ex vivo and in vitro frameworks.

Our results uncover a new function of NBS1 at the PC impacting on SHH signaling, in addition to its recognized role in the DDR. This opens new fields of investigation for the Nijmegen Breakage Syndrome and could offer an alternative reading frame for the understanding of commonly observed phenotypes (i.e. microcephaly) that interlink neurological disorders occurring in ciliopathies and DDR-defective syndromes.

Un nuovo ruolo della proteina NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1) al cilio primario e nella via di segnalazione di Hedgehog è rilevante per lo sviluppo cerebellare ed del medulloblastoma

La sindrome di Nijmegen (NBS) è una rara malattia genetica caratterizzata da microcefalia, difetti dell'immunità e predisposizione al cancro. Essa è dovuta a mutazioni di NBS1, un componente del complesso MRN, che esercita un ruolo fondamentale nel proteggere le nostre cellule dall'accumulo di danni al DNA (compresi quelli derivanti da processi fisiologici come la replicazione del DNA) che minacciano la stabilità del genoma e la sopravvivenza di molteplici 'lineages' cellulari, tra cui in particolare i precursori dei neuroni. Mentre molte manifestazioni della malattia sono facilmente riconducibili a questo modello interpretativo, la straordinaria sensibilità ai difetti genetici di NBS1 manifestata dal sistema nervoso è ancora poco compresa. Nostri dati preliminari e specifiche informazioni tratte dalla letteratura scientifica ci hanno consentito di formulare una ipotesi del tutto innovativa, che suggerisce che NBS1 potrebbe avere ulteriori funzioni rispetto a quelle fin ora conosciute ed in particolare potrebbe essere importante nel regolare vie biochimiche essenziali per lo sviluppo del sistema nervoso. In particolare, i nostri dati indicano che NBS1 si localizza al basal body del cilio primario (PC), un organello cellulare coinvolto in specifici meccanismi di segnalazione (come la via di Sonic Hedgehog, SHH). La deplezione di NBS1 in sistemi cellulari ed in modelli animali determina significative alterazioni morfologiche e funzionali del PC ed una perdita di funzione della via di SHH che impediscono il corretto sviluppo postnatale del cervelletto. Questi dati aprono a nuove interpretazioni circa la patogenesi delle manifestazioni neurologiche della Sindrome di Nijmegen.

Il quadro neurologico dei pazienti affetti da NBS non ha ancora una cura e, sfortunatamente, i nostri dati non forniscono ancora una concreta prospettiva di trattamento per questi pazienti. Tuttavia, riteniamo che solo un significativo avanzamento delle conoscenze sulle cause molecolari di questa patologia e delle sue manifestazioni potrà consentire di disegnare una opportuna ed efficace strategia di intervento nel prossimo futuro.

Disease Name:

Nijmegen Breakage Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Nijmegen

Project number:

GGP20135

45. THE ALTERATION OF MITOCHONDRIAL ENERGETIC METABOLISM CONTRIBUTES TO THE PATHOGENESIS OF POSTERIOR COLUMN ATAXIA AND RETINITIS PIGMENTOSA

Bertino F.^[1], Grasso E.^[1], Kopecka J.^[2], Hentschel A.^[3], Bellini S.^[4], Barutta F.^[4], Bonora M.^[5], Pinton P.^[5], Roos A.^[6], Riganti C.^[2], Tolosano E.^[1], Chiabrando D.*^[1]

^[1]Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Turin, Turin, Italy ~ Torino ~ Italy, ^[2]Dept. of Oncology, Univeristy of Torino ~ Torino ~ Italy, ^[3]Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V, Dortmund, Germany ~ Dortmund ~ Germany, ^[4]Department of Medical Sciences ~ Torino ~ Italy, ^[5]Laboratory for Technologies of Advanced Therapies (LTTA), Section of Experimental Medicine, Department of Medical Science, University of Ferrara ~ Ferrara ~ Italy, ^[6]Department of Pediatric Neurology, Centre for Neuromuscular Disorders, Centre for Translational Neuro- and Behavioral Sciences, University Duisburg-Essen, Essen, Germany ~ Essen ~ Germany

Posterior Column Ataxia and Retinitis Pigmentosa (PCARP) is an autosomal-recessive disorder characterized by sensory ataxia, retinitis pigmentosa and pain-insensitivity. It is caused by mutations in the Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor 1 (FLVCR1) gene, encoding a broadly expressed heme exporter. Most of the mutations identified so far affect the expression or function of FLVCR1a, one of the two isoforms encoded by the FLVCR1 gene. However, how alterations in FLVCR1a lead to the pathogenesis of PCARP is still unclear. Previous studies showed that FLVCR1 mutations impair plasma membrane heme efflux in patient-derived cells. Therefore, it has been proposed that the impairment of FLVCR1a function may cause heme accumulation and cellular damage by heme toxicity. However, experimental evidence in support of this hypothesis is poor. Interestingly, it has been recently demonstrated that the export of heme through FLVCR1a is necessary to sustain endogenous heme biosynthesis, specifically to reduce the amount of free-heme that would inhibit the rate-limiting enzyme in heme biosynthesis, ALAS1. Indeed, FLVCR1a downmodulation affect endogenous heme synthesis with important consequences on energetic metabolism in cancer cells (1). These data prompt us to specifically evaluate whether dysfunction in mitochondrial energetic metabolism may contribute to the pathogenesis of PCARP.

To address this issue, we performed metabolic and proteomic analyses on four PCARP patients, two asymptomatic carriers and three healthy individuals. We provide evidence of mitochondrial dysfunction and increased lipid peroxidation in PCARP fibroblasts compared to controls. Indeed, PCARP fibroblasts showed reduced heme synthesis rates as well as reduced TCA cycle flux, OXPHOS, oxygen consumption rates associated with the alteration of mitochondrial morphology and increased lipid peroxidation. Furthermore, our data suggest that FLVCR1 function is not completely lost in PCARP fibroblasts and we provide a proof of concept that the restoration of mitochondrial function is feasible in PCARP fibroblasts.

This study defines PCARP as a tissue-specific mitochondrial disease thus providing new insights into the pathogenesis of the disease. Furthermore, this study represents an important step forward to the identification of a therapeutic approach for PCARP patients.

TITOLO:

L'alterazione del metabolismo energetico mitocondriale contribuisce alla patogenesi dell' atassia del cordone posteriore e retinite pigmentosa

ABSTRACT:

L'atassia del cordone posteriore e retinite pigmentosa (PCARP) è una malattia genetica rara caratterizzata dalla degenerazione progressiva dei neuroni sensoriali e dei fotorecettori. La perdita di tali cellule causa atassia, mancata percezione del dolore e perdita della visione. La malattia è causata da mutazioni nel gene chiamato Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor 1 (FLVCR1) gene. La maggior parte delle mutazioni identificate finora influenza l'espressione e funzione della proteina FLVCR1a, una delle proteine codificate da quel gene. Il motivo per cui mutazioni nel gene FLVCR1 causano la PCARP è ancora sconosciuto e non esiste una terapia specifica per i pazienti affetti da PCARP. E' stato precedentemente dimostrato che le mutazioni nel gene FLVCR1 compromettono la capacità della proteina FLVCR1a di trasportare l'eme. E' stato quindi ipotizzato che la malattia potesse essere determinata da un accumulo tossico di eme nelle cellule del paziente. Le evidenze a sostegno di questa ipotesi sono poche. E' stato recentemente dimostrato che l'esporto di eme attraverso FLVCR1a è necessario per sostenere la sintesi endogena di eme, in particolare per evitare l'inibizione di un enzima chiave nella produzione di eme. Infatti, la diminuzione dell'espressione di FLVCR1a in cellule tumorali determina una riduzione della sintesi endogena di eme con importanti conseguenze sul metabolismo energetico cellulare (1). Questi risultati ci hanno indotto a valutare se la PCARP potesse essere causata da un difetto del metabolismo energetico.

Per rispondere a questa domanda, abbiamo effettuato esperimenti di proteomica ed analisi metaboliche su fibroblasti isolati da pazienti con PCARP, portatori sani ed individui sani. Abbiamo dimostrato che le cellule dei pazienti mostrano un'alterazione del metabolismo energetico. In particolare i fibroblasti dei pazienti mostrano una diminuita sintesi di eme, una riduzione del flusso degli acidi tricarbossilici, della fosforilazione ossidativa e del consumo dell'ossigeno. A questo si associa un'alterazione della morfologia mitocondriale e un aumento della perossidazione lipidica. Infine, le nostre ricerche suggeriscono inoltre che le mutazioni nel gene FLVCR1 non causano una completa perdita della funzione del trasportatore e che, almeno in vitro, è possibile ripristinare il metabolismo energetico.

I risultati delle nostre ricerche suggeriscono che l'alterazione del metabolismo energetico possa rappresentare un importante meccanismo patogenetico responsabile dell'insorgenza della PCARP. Inoltre, questo studio rappresenta un significativo passo in avanti verso l'identificazione di un approccio terapeutico per la PCARP.

Disease Name:

Posterior Column Ataxia and Retinitis Pigmentosa

Nome malattia:

Atassia del cordone posteriore e retinite pigmentosa

Project number:

GMR22T1076

46. CORTICOSPINAL TRACT MICROSTRUCTURAL INTEGRITY AND ITS CORRELATION WITH CLINICAL AND MOLECULAR BIOMARKERS: A PROFILOMETRY MRI STUDY TO IDENTIFY IN-VIVO BIOMARKERS OF DISEASE SEVERITY IN ARSACS

Cocozza S.*

University of Naples "Federico II" ~ Naples ~ Italy

Background and rationale

To date, no quantitative biomarker for disease monitoring is available in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). Specifically, although affected patients present with progressive spasticity related to corticospinal tract (CST) damage, only few studies have investigated the integrity of this structure, and none has explored the relation between CST damage and clinical severity.

Methods

We will analyze data collected within the scope of the PROSPAX project, a multi-center European prospective natural history study that includes clinical, molecular and imaging data of 57 ARSACS patients, along with 35 age and gender matched healthy controls (HC). In all subjects, metrics of axonal damage and fiber demyelination will be extracted from diffusion MRI (dMRI), and evaluated using a profilometry approach, a joint analysis of multiple metrics calculated along tracts reconstructed from individual subject tractography, allowing us to explore the presence of a gradient of pathology along the tract. dMRI metrics will be correlated with the neurofilament light chain (NfL), a serum biomarker of axonal damage, as well as clinical scores.

Anticipated outputs

As CST damage in ARSACS has been mainly described at the level of the pons, we expect to find a well defined gradient of damage ascending from the pons to the cortex. This gradient of damage

will be characterized by a predominant alteration in dMRI metrics reflecting axonal damage rather than fiber demyelination. Such damage will be correlated with NFL levels and with the degree of spasticity, with stronger correlations between those portions of the CST neighboring the pons (more damaged) rather than those more proximal to the cortex (less damaged). Our results will provide the first quantitative MRI biomarker for monitoring disease progression and severity in ARSACS, and, potentially, for measuring treatment response in future clinical trials.

Valutazione del danno microstrutturale del fascio corticospinale e correlazione con marcatori clinici e molecolari: uno studio di profilometria RM per identificare potenziali biomarcatori di malattia in pazienti ARSACS.

I pazienti affetti da atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS) presentano progressive difficoltà nel camminare in parte dovute alla presenza di rigidità muscolare (spasticità). Questo sintomo è dovuto al coinvolgimento di un fascio di fibre nervose che controlla il movimento volontario (il tratto corticospinale-TCS), ma, ad oggi, non sappiamo quale porzione delle fibre che lo costituiscono siano danneggiate né se sia associato alla disabilità dei pazienti. In questo studio investigheremo l'integrità microstrutturale delle fibre che compongono il TCS con un approccio innovativo di analisi dei dati di Risonanza Magnetica (RM), chiamato profilometria, in un numeroso gruppo di pazienti affetti da ARSACS. Per raggiungere questo scopo useremo i dati messi a disposizione dal progetto PROSPAX, un progetto multicentrico europeo che ha l'obiettivo di studiare la progressione nel tempo delle atassie spastiche integrando dati clinici, molecolari e di RM. Le informazioni sul danno microstrutturale estratte dai dati di RM verranno correlate con una proteina indicatrice di danno delle fibre nervose misurabile nel sangue e con lo stato clinico dei pazienti. La nostra ipotesi è che nei pazienti ARSACS sia presente un pattern caratteristico di danno del TCS, correlato ad elevati livelli di danno delle fibre nervose ed alla disabilità. Il nostro studio porterà all'identificazione di un biomarcatore di malattia derivabile dalla RM in modo non invasivo, che consenta di quantificare il danno cerebrale in modo altamente attendibile e riproducibile e che possa essere usato per monitorare l'andamento di malattia e, in futuro, la risposta a interventi terapeutici.

Disease Name:

Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS)

Nome malattia:

Atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS)

Project number:

GSA21G005

47. DANIO RERIO AS A MODEL TO REVEAL NEW INSIGHT OF RETINAL DEFECTS IN ARSACS

Galatolo D., Licitra R., Damiani D., Ogi A., Marchese M., Mero S., Santorelli F.M., Naef V.*

IRCCS FONDAZIONE STELLA MARIS ~ Pisa ~ Italy

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) is a rare early-onset neurodegenerative disease associated with mutations in the SACS gene, which encodes saccin, a 520 kDa multidomain protein. The principal hallmark of this disorder comprises atrophy of the upper vermis and loss of Purkinje cells (PCs) in the cerebellum. Loss of saccin causes accumulation and bundling of perikaryal and dendritic neurofilaments with impaired mitochondrial dynamics (1). Most patients with ARSACS present the triad of spastic ataxia with peripheral neuropathy and upper cerebellar vermis atrophy. Retinal abnormalities are highly specific for

ARSACS, and suggest retinal hyperplasia due to abnormal retinal development, thought the precise nature of retinal changes in ARSACS remains obscure (2). There is limited availability of human ocular and brain tissues, and there are few animal models for ARSACS that replicate the neuropathology and clinical phenotype seen in this disorder. *Sacs*^{-/-} mice recapitulate well the phenotypic features seen in patients and the cellular characteristics in neuronal cells including reduced Purkinje cell firing rates, somatodendritic neurofilament bundles in Purkinje cells and cell loss in the cerebellum. Yet, retinal defects in mice have not been shown (3). Recently, we generated a zebrafish *sacs*-null mutant line that replicates main features of ARSACS (4). In mutant embryos, we observed an increase in apoptotic cells densely distributed in the area of the eyes, a finding likely associated with the moderate "microphthalmia" seen in mutants. We also observed impaired visual function recorded using the optokinetic response in *sacs*^{-/-} zebrafish. With eyes similar to humans in structure and function, zebrafish has become an established tool to study vision in vertebrates. Our main hypothesis is that null-*sacs* zebrafish embryos can help to disentangle the retinal phenotype of ARSACS. Our goal is to analyse more precisely putative retinal defects driven by the loss of saccin in our model, with a future translational therapeutic value.

Danio rerio come modello per svelare nuove informazioni sui difetti retinici nell'atassia di Charlevoix-Saguenay (ARSACS).

L'atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS) è una rara malattia neurodegenerativa ad esordio precoce associata a mutazioni nel gene SACS, che codifica per la saccina, una proteina multidominio di 520 kDa. Il segno distintivo principale di questo disturbo comprende l'atrofia del verme superiore e la perdita delle cellule di Purkinje (PC) nel cervelletto. La perdita di saccina causa l'accumulo e il raggruppamento di neurofilamenti pericarici e dendritici con dinamica mitocondriale alterata (1). La maggior parte dei pazienti con ARSACS presenta la triade di atassia spastica con neuropatia periferica e atrofia del verme cerebellare superiore. Le anomalie retiniche sono altamente specifiche per l'ARSACS e suggeriscono un'iperplasia retinica dovuta a uno sviluppo anormale della retina, sebbene la natura precisa dei cambiamenti retinici nell'ARSACS rimanga oscura (2). C'è una disponibilità limitata di tessuti oculari e cerebrali umani e ci sono pochi modelli animali per ARSACS che replicano la neuropatologia e il fenotipo clinico osservati in questo disturbo. I topi *Sacs*^{-/-} ricapitolano bene le caratteristiche fenotipiche osservate nei pazienti e le caratteristiche cellulari nelle cellule neuronali, tra cui velocità di attivazione delle cellule di Purkinje ridotte, fasci di neurofilamenti somatodendritici nelle cellule di Purkinje e perdita di cellule nel cervelletto. Tuttavia, i difetti retinici nei topi non sono stati dimostrati (3). Recentemente, abbiamo generato una linea mutante di zebrafish con assenza di saccina che replica le caratteristiche principali di ARSACS (4). Negli embrioni mutanti, abbiamo osservato un aumento delle cellule apoptotiche densamente distribuite nell'area degli occhi, un evento probabilmente associato alla moderata "microftalmia" osservata nei mutanti. Abbiamo anche osservato una funzione visiva compromessa valutata utilizzando la risposta optocinetica in *sacs*^{-/-} zebrafish. Con occhi simili agli umani per struttura e funzione, il pesce zebra è diventato uno strumento consolidato per studiare la vista nei vertebrati. La nostra ipotesi principale è che gli embrioni di zebrafish null-*sacs* possano aiutare a districare il fenotipo retinico di ARSACS. Il nostro obiettivo è analizzare più precisamente i presunti difetti retinici guidati dalla perdita di saccina nel nostro modello, con un futuro valore terapeutico traslazionale.

Disease Name:

Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS)

Nome malattia:

Atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS)

Project number:

GSA21G006

48. DEVELOPMENT OF AN ALLELE-SPECIFIC EPIGENETIC SILENCING PLATFORM FOR THE TREATMENT OF SCA2

Coglot A.*, Cappelluti M., Migliara A., Valsoni S., Merelli I., Lombardo A.

San Raffele Telethon Institute for Gene therapy, IRCCS San Raffele Scientific Institute, ~ Milan (MI) ~ Italy

Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is a rare neurodegenerative autosomal disease caused by pathogenic expansions of a CAG repeat in the gene Ataxin-2 (ATXN2). In SCA2 patient's one allele of ATXN2 gene contains over 33 of CAG repeats while the wild-type allele contains a 22-long repetition of three nucleotides. The link between the pathogenic expansion and the clinical signs is poorly understood. However, the most accredited hypothesis indicates that the CAG expansion forms toxic products in the neurons, causing a progressive debilitating motor impairment in SCA2 patients. The prognosis is poor, and the currently available pharmacologic interventions are just symptomatic and unable to halt disease progression. A recent gene therapy approach based on Antisense Oligonucleotide (ASO)-mediated knock-down of ATXN2 promises to deliver a cure for SCA2. However, its clinical translation might be hampered by safety concerns, including the need of using potentially harmful medical procedures to repeatedly administer the drug and its lack of allele selectivity. In this project, we overcome these limitations by using targeted epigenetic editors also called Engineered Transcriptional Repressors (ETRs). The therapeutic potential of this technology resides in its hit-and-run mode of action, which allows to permanently silence a desired gene upon a single administration. However, ETR lacks allelic discrimination and the silencing/inactivation of the non-pathogenic ATXN2 allele may represent a potential threat for neurons. To solve this issue, we are optimizing the technology, enforcing expansion-length selectivity to the ETRs through their rational engineering and using unbiased high-throughput approaches. We develop a broadly applicable fluorescent reporter cell model for the identification of expansion-length selective gene silencing reagents and in-depth characterization of the specificity profile of the technology. Beyond the direct fallouts in the treatment of SCA2, this improved epi-editing technology will be portable to other trinucleotide repeat expansion diseases.

Sviluppo di una piattaforma di silenziamento epigenetico allele-specifica per il trattamento della malattia SCA2.

L'Atassia Spinocerebellare di tipo 2 (SCA2) è una malattia rara debilitante del sistema nervoso causata da mutazioni nel gene Ataxin-2 (ATXN2). In soggetti sani, ATXN2 contiene 22 ripetizioni di un determinato tri-nucleotide, una sequenza composta da 3 specifici nucleotidi, mentre nei pazienti una delle due copie di questo gene contiene più di 33 ripetizioni. Il collegamento tra quest'espansione e il quadro clinico della malattia è poco conosciuto. L'ipotesi più accreditata è che la proteina codificata dal gene espanso formi dei prodotti tossici per i neuroni, importanti cellule del sistema nervoso. Sfortunatamente, la prognosi dei pazienti SCA2 è infausta e i trattamenti farmacologici ad oggi a disposizione sono unicamente sintomatici. Un recente approccio di terapia genica sembra promettere una cura per SCA2. Tuttavia, il fatto che inibisca non solo l'espressione della copia espansa del gene ma anche di quella normale costituisce un potenziale pericolo. L'obiettivo di questo progetto è sviluppare un nuovo approccio di terapia genica in grado di spegnere selettivamente la copia espansa del gene, lasciando inalterata quella normale. Per raggiungere questo obiettivo ottimizzeremo una tecnologia da noi precedentemente sviluppata che prende il nome di editing epigenetico. Questa si basa sulla somministrazione transiente di proteine artificiali in grado di riconoscere il loro gene bersaglio e di modificare in modo permanente il codice epigenetico che ne regola l'espressione. Il successo di questo progetto

aprirebbe la strada allo sviluppo di una strategia terapeutica sicura ed efficiente per SCA2, e potenzialmente applicabile ad altre malattie causate da espansioni di trinucleotidi.

Disease Name:

Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)

Nome malattia:

Atassia Spinocerebellare di tipo 2

Project number:

GSP20003_PAsAtaxia029

49. PPAR GAMMA AGONIST PIOGLITAZONE RESTORES MITOCHONDRIAL QUALITY CONTROL IN FIBROBLASTS OF PITRM1 DEFICIENT PATIENTS

Di Donfrancesco A.^[1], Berlingieri C.^[1], Giacomello M.^[2], Bindoff L.^[3], Segel R.^[4], Rembaum P.^[4], Santorelli F.^[5], Viscomi C.^[2], Zeviani M.^[6], Ghezzi D.^[1], **Brunetti D.*^[1]**

^[1]Unit of Medical Genetics and Neurogenetics Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta ~ Milan ~ Italy, ^[2]Department of Biomedical Sciences, University of Padua ~ Padua ~ Italy, ^[3]Department of Clinical Medicine, University of Bergen ~ Bergen ~ Norway, ^[4]Shaare Zedek Medical Center ~ Jerusalem ~ Israel, ^[5]Molecular Medicine and Neurogenetics, IRCCS Stella Maris Foundation ~ Pisa ~ Italy, ^[6]Department of Neurosciences, University of Padova ~ Padua ~ Italy

We recently reported that loss of function mutations in PITRM1 are associated with a slow-progressing neurodegenerative syndrome characterized by spinocerebellar ataxia, psychotic episodes and cognitive decline.

During the import of mitochondrial proteins encoded by the nuclear genome, the mitochondrial targeting sequence (MTS) is cleaved by the mitochondrial processing peptidase (MPP), and further degraded by the pitrilysin metalloprotease PITRM1, a 117 kDa mitochondrial matrix enzyme, in collaboration with the mitochondrial isoform of the Insulin Degrading Enzyme (IDE).

Using patient derived fibroblasts we found that defective PITRM1 leads to the accumulation of the MTS, which disrupt the membranes, resulting in uncoupling and dissipation of the mitochondrial membrane potential.

This induces a feedback inhibition of MPP activity, which, in turn, impairs the processing and maturation of imported proteins.

Because mitochondrial peptidases are also involved in the maturation of the human frataxin, the protein mutated in Friedreich's ataxia, we examined frataxin maturation by immunoblotting in fibroblasts and we found that PITRM1 mutated cells showed a significative reduced amount of mature Frataxin (mFXN) compared to controls.

We therefore hypothesized that upregulation of IDE, could restore mitochondrial proteostasis, partially compensating for the PITRM1 deficiency.

We found that pharmacological stimulation of IDE by PPAR γ agonist Pioglitazone restored the presequence processing machinery improving frataxin maturation and mitochondrial function.

Our findings provide mechanistic insights and suggest a potential pharmacological strategy for this rare neurodegenerative mitochondrial disease.

Efficacia del pioglitazone nel ripristinare la funzionalità mitocondriale in fibroblasti di pazienti con deficit di PITRM1

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che mutazioni del gene PITRM1, che codifica per una peptidasi dei mitocondri, organelli fondamentali per la produzione di energia nelle

cellule, sono associate allo sviluppo di una forma di atassia spinocerebellare autosomica recessiva. PITRM1 ha il ruolo di assicurare che altre proteine importanti per i mitocondri “maturino” correttamente per svolgere la loro funzione. Quando la proteina PITRM1 è mutata questo sistema di maturazione non funziona e proteine immature o non funzionanti tendono ad accumularsi, provocando una disfunzione mitocondriale. Una delle proteine la cui corretta maturazione richiede PITRM1 è la fratassina, la proteina mutata nell’atassia di Friedreich.

In questo studio abbiamo evidenziato che il processamento della fratassina è alterato nelle cellule dei pazienti con mutazione di PITRM1. Abbiamo anche dimostrato che il trattamento delle cellule dei pazienti con il Pioglitazone, un farmaco appartenente alla classe dei tiazolidindioni, migliora la maturazione della fratassina e ripristina la funzionalità dei mitocondri. I nostri risultati forniscono approfondimenti meccanicistici e suggeriscono una potenziale strategia farmacologica per questa rara malattia mitocondriale neurodegenerativa.

Disease Name:

Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive

Nome malattia:

Atassia spinocerebellare autosomica recessiva

Project number:

GSP20003_PAsAtaxia002

50. EXPLAINABLE ARTIFICIAL INTELLIGENCE AND FRACTAL DIMENSION OF BRAIN MRI IN FRIEDREICH ATAXIA AND SCAS

Marzi C.^[1], Lai M.^[2], Scheda R.^[2], Orsolini S.^[2], Mascalchi M.^[3], Harding I.^[4], Diciotti S.*^[2]

^[1]Department of Statistics, Computer Science and Applications “Giuseppe Parent” (DiSIA), University of Florence (UniFI) ~ Florence ~ Italy, ^[2]Department of Electrical, Electronic, and Information Engineering “Guglielmo Marconi” (DEI), University of Bologna (UniBO) ~ Cesena ~ Italy, ^[3]Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences “Mario Serio”, University of Florence ~ Florence ~ Italy, ^[4]Department of Neuroscience and Monash Biomedical Imaging, Monash University ~ Melbourne ~ Australia

Friedreich (FRDA) and spinocerebellar ataxias (SCAs) are slowly progressing and highly debilitating diseases. The fractal dimension (FD) is a promising quantitative index of structural brain complexity derived from magnetic resonance imaging (MRI) data, with the potential to provide further insights into the changes underlying abnormal brain development and aging in these diseases.

We collected brain MRI, genetic and clinical data of 845 patients with inherited cerebellar disorders and 1125 healthy controls (HC) from 16 clinical centers through the ENIGMA-Ataxia international consortium. We developed a computational pipeline and strict quality control for T1-weighted MRI image processing. Cerebral and cerebellar gray matter (GM) and white matter (WM) segmentation, volume, cortical thickness, and FD measures were extracted. After feature harmonization using Combat algorithm, we adopted an explainable artificial intelligence based on XGBoost and SHAP explanations to evaluate the FD as a novel imaging biomarker in identifying, at a single-patient level, FRDA or SCAs patients vs. HC. Specifically, we conducted a study in FRDA (302 patients vs. 598 age- and sex-matched HC), SCA1 (110 patients vs. 608 HC), SCA2 (84 patients vs. 294 HC), SCA3 (200 patients vs. 527 HC), SCA6 (42 patients vs. 74 HC), and SCA7 (10 patients vs. 24 HC). In all diseases, the area under the receiver operating curve (ROC) in classifying disease vs. HC group was excellent (range 0.79-0.96). More importantly, the FD of the cerebellar WM or GM was the top-ranking classifying feature, or the second one, for all diseases. Moreover, several FD

abnormalities significantly correlated with genetic and clinical features (multiple comparisons adjusted p-value < 0.05).

Our study results indicate that FD may represent a consistent feature in characterizing inherited ataxias that can complement standard imaging and provides leading innovation and cutting-edge computational approaches to better understand disease pathophysiology.

L'atassia di Friedreich (FRDA) e le atassie spinocerebellari (SCA) sono malattie rare lentamente progressive e altamente debilitanti. È fondamentale comprendere e prevedere la variabilità tra individui e identificare degli indicatori per il monitoraggio del trattamento da utilizzare negli studi futuri di terapia genica e farmacologica. L'identificazione di indicatori di progressione della malattia, derivati da immagini di risonanza magnetica (RM), potrebbe facilitare la conduzione di futuri studi clinici nell'uomo. La dimensione frattale (FD, fractal dimension) è un promettente indicatore quantitativo di complessità strutturale dell'encefalo e ha il potenziale di fornire importanti informazioni sulle alterazioni alla base dello sviluppo e dell'invecchiamento dell'encefalo in queste malattie. In questo progetto abbiamo raccolto dati di RM cerebrale, genetici e clinici di 845 pazienti con disordini cerebellari ereditari e 1125 controlli sani (HC) da 16 centri clinici attraverso il consorzio internazionale ENIGMA-Ataxia. Abbiamo sviluppato una pipeline computazionale e un rigoroso controllo di qualità per l'elaborazione delle immagini di RM pesate in T1. Sono stati estratti la segmentazione della materia grigia (GM, gray matter) e della materia bianca (WM, white matter) cerebrale e cerebellare, il volume, lo spessore corticale e le misure di FD. Dopo l'armonizzazione delle caratteristiche mediante l'algoritmo Combat, abbiamo implementato un framework di intelligenza artificiale (XAI, eXplainable Artificial Intelligence) per valutare la FD come nuovo biomcatore di imaging nell'identificazione, a livello di singolo paziente, dei pazienti FRDA o SCA rispetto agli HC. In particolare, abbiamo condotto uno studio su FRDA (302 pazienti vs. 598 HC appaiati per età e sesso), SCA1 (110 pazienti vs. 608 HC), SCA2 (84 pazienti vs. 294 HC), SCA3 (200 pazienti vs. 527 HC) e SCA6 (42 pazienti vs. 74 HC), and SCA7 (10 pazienti vs. 24 HC). In tutte le patologie, l'area sotto la curva ROC nella classificazione della malattia rispetto al gruppo HC è stata eccellente (range 0.79-0.96). In aggiunta, la FD della WM o della GM cerebellare è risultata l'indice più importante – o il secondo più importante - per la classificazione in tutte le malattie. Inoltre, diverse anomalie della FD sono risultate significativamente correlate con le caratteristiche genetiche e cliniche ($p < 0,05$ aggiustato per confronti multipli).

I risultati del nostro studio indicano che la FD può rappresentare un indice coerente nella caratterizzazione delle atassie ereditarie, in grado di integrare l'imaging standard e di fornire innovazione e approcci computazionali all'avanguardia per comprendere la fisiopatologia della malattia.

Disease Name:

Spinocerebellar ataxia; Friedreich ataxia

Nome malattia:

Atassia spinocerebellare; Atassia di Friedreich

Project number:

GSP20003_PAsAtaxia016

Genetic neurological disorder\Epilepsy and Seizures

51. ANALYSIS OF INSYN1 FUNCTIONING IN THE REGULATION OF INHIBITORY NEURONAL TRANSMISSION IN A MOUSE MODEL OF CDKL5 DEFICIENCY DISORDER

Valetti G., Baldin S., De Rosa R., Carmone C., Lora C., Valastro S., Kilstrup--Nielsen C., Barbiero I.*

University of Insubria ~ Busto Arsizio ~ Italy

CDKL5 disorder (CDD) is a rare genetic disorder characterized by early-onset drug-resistant epileptic encephalopathy, motor, cognitive, visual and autonomic disorders. CDD is caused by mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) gene and occurs with an incidence of 1 in 40,000 live births. Despite the efforts of the researchers, much remains to be elucidated about the role of CDKL5 in the central nervous system, which hinders the achievement of an effective therapy for CDD. The epileptic seizures and cognitive deficits that occur in CDD patients emphasize the importance of the protein in the correct regulation of neuronal activity, which is based on a complex balance between excitation and inhibition. While the part concerning excitation is largely investigated, the function of CDKL5 at the inhibitory compartment remains mostly unknown. In this regard, we have collected preliminary data demonstrating an interaction between CDKL5 and InSyn1, a TDark protein that appears to be particularly important for the correct functioning of the inhibitory network. In particular, InSyn1 regulates the function of the dystrophin-dystroglycan complex (DGC), which serves for the formation of specific inhibitory neurons, essential for "turning off" and regulating the excitation that is generated physiologically by neurons. Furthermore, the loss of InSyn1, as well as CDKL5, is associated with defects in GABAAR clustering and elevated neuronal activity in the hippocampus, underlining their possible belonging to common molecular pathways. Interestingly, we found that InSyn1 is differently expressed in different brains area of Cdkl5-KO adult mice suggesting a possible overall impairment of inhibitory connectivity, which is currently under investigation.

Altogether, with this project we will explore the impact of CDKL5 loss on InSyn1 and DGC in the inhibitory compartment. We believe that these aspects, which have never been investigated before in the CDD field, represent an important step forward to clarify the role of CDKL5 in inhibitory circuits and to design more effective therapeutic strategies for CDD patients.

Analisi della funzionalità di InSyn1 nella regolazione della trasmissione neuronale inibitoria in assenza di CDKL5

La malattia da deficit di CDKL5 (CDD) è una patologia genetica rara caratterizzata da encefalopatia epilettica resistente ai farmaci ad esordio precoce, disturbi motori, cognitivi, visivi e autonomici. CDD è causata da mutazioni nel gene cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5), localizzato sul cromosoma X, e occorre con un'incidenza di 1 su 40.000 nati vivi. Nonostante gli sforzi dei ricercatori, resta ancora molto da chiarire sul ruolo di CDKL5 nel sistema nervoso centrale, ciò ostacola il raggiungimento di una terapia efficace per CDD. Le crisi epilettiche e i deficit cognitivi che si verificano nei pazienti con CDD sottolineano l'importanza della proteina nella corretta regolazione dell'attività neuronale, che si basa su un complesso equilibrio tra eccitazione e inibizione. Mentre la parte riguardante l'eccitazione è ampiamente studiata, la funzione di CDKL5 nel compartimento inibitorio rimane per lo più sconosciuta. A questo proposito, abbiamo raccolto dati preliminari che dimostrano un'interazione tra CDKL5 e InSyn1, una proteina TDark che sembra essere particolarmente importante per il corretto funzionamento della trasmissione inibitoria. In particolare, InSyn1 regola la funzione del complesso distrofina-distroglicano (DGC), che serve per la formazione di neuroni inibitori specifici, essenziali per "spegnere" e regolare l'eccitazione che viene generata fisiologicamente dai neuroni. Inoltre, la perdita di InSyn1, così

come CDKL5, è associata a difetti nel clustering dei recettori GABAA e ad elevata attività neuronale nell'ippocampo, sottolineando la possibile appartenenza di queste due proteine a percorsi molecolari comuni. I nostri dati preliminari mostrano che InSyn1 è espresso in modo diverso in diverse aree cerebrali di topi adulti Cdkl5-KO, suggerendo una possibile compromissione complessiva della connettività inibitoria, che è attualmente oggetto di indagine.

Complessivamente, con questo progetto esploreremo l'impatto della perdita di CDKL5 su InSyn1 e DGC nel compartimento inibitorio. Riteniamo che questi aspetti, mai indagati prima nel campo della CDD, rappresentino un importante passo avanti per chiarire il ruolo di CDKL5 nei circuiti inibitori e per progettare strategie terapeutiche più efficaci per i pazienti con CDD.

Disease Name:

CDKL5 deficiency disorder

Nome malattia:

Malattia da deficit di CDKL5

Project number:

GJC21015

52. IN VIVO CROSS-CORRECTION ENHANCES THE EFFICACY OF GENE THERAPY IN A MOUSE MODEL OF CDKL5 DEFICIENCY DISORDER

Medici G.*^[1], Tassinari M.^[1], Galvani G.^[1], Gennaccaro L.^[1], Loi M.^[1], Mottolese N.^[1], Candini G.^[1], Giustetto M.^[2], Pizzorusso T.^[3], Hiroyuki N.^[4], Trazzi S.^[1], Ciani E.^[1]

^[1]University of Bologna ~ Bologna ~ Italy, ^[2]Univeristà di Torino ~ Torino ~ Italy, ^[3]Università di Firenze ~ Firenze ~ Italy, ^[4]Oregon Health And Science University ~ Portland ~ United States of America

No therapy is currently available for CDKL5 deficiency disorder (CDD), a severe neurodevelopmental disorder caused by mutations in the CDKL5 gene. Although delivery of a wild-type copy of the mutated gene to cells represents the most curative approach for a monogenic disease, proof-of-concept studies highlight significant efficacy caveats for treatment of brain diseases. The major caveat regards the low efficiency of gene delivery to the CNS by viral vectors, and risk of toxic side effects connected with large vector doses. Herein, we developed a cross-correction-based strategy to enhance the efficiency of a gene therapy for CDD. We created a vector for gene therapy that produces an Igk-TATk-CDKL5 fusion protein that can be secreted via constitutive secretory pathways in view of the properties of the Igk-chain leader sequence polypeptide. Importantly, due to the transduction property of the TATk peptide, the secreted fusion protein can be internalized by cells. We carried out a comparative evaluation of CDKL5 and TATk-CDKL5 protein biodistribution in vivo and the effect of intravascular treatment with the AAVPHP.B_CDKL5 vector or AAVPHP.B_Igk-TATk-CDKL5 vector on brain structure and behavior in adult symptomatic Cdkl5 knockout (KO) mice. We found that, although AAVPHP.B_Igk-TATk-CDKL5 and AAVPHP.B_CDKL5 vectors had similar brain infection efficiency, the AAVPHP.B_Igk-TATk-CDKL5 vector led to a higher CDKL5 protein replacement due to secretion and transduction of the TATk-CDKL5 protein into the neighboring cells. Importantly, Cdkl5 KO mice treated with the AAVPHP.B_Igk-TATk-CDKL5 vector showed a behavioral and neuroanatomical improvement in comparison with vehicle-treated or AAVPHP.B_CDKL5 vector-treated Cdkl5 KO mice. Hence, we provide the first evidence that a gene therapy based on a cross-correction approach is more effective at compensating Cdkl5-null brain defects than gene therapy based on the expression of the native CDKL5, opening avenues for the development of this innovative approach for other monogenic diseases.

Un innovativo approccio di terapia genica basato su una proteina CDKL5 ricombinante è più efficace di un approccio classico nel correggere i difetti nel modello murino della patologia CDKL5. Nessuna terapia è attualmente disponibile per il disturbo da deficit di CDKL5 (CDD), un grave disturbo dello sviluppo neurologico causato da mutazioni nel gene CDKL5. Sebbene fornire una copia sana del gene mutato alle cellule rappresenti l'approccio più curativo per una malattia causata da mutazioni in un unico gene, gli studi hanno evidenziato ostacoli significativi all'efficacia di questo trattamento per le malattie cerebrali. Il problema principale riguarda la bassa efficienza di arrivo dell'informazione genica al sistema nervoso centrale tramite l'uso di vettori virali e il rischio di effetti collaterali tossici connessi a grandi dosi di vettori. Abbiamo quindi sviluppato una strategia per migliorare l'efficienza di una terapia genica per CDD basata su di una proteina CDKL5 modificata. Grazie a questa modifica, la proteina CDKL5 che viene prodotta dalle cellule che sono state raggiunte dall'informazione genica tramite virus, può essere secreta all'esterno della cellula; la proteina così secreta può essere poi internalizzata dalle cellule adiacenti che non hanno invece ricevuto l'informazione per produrla loro stesse. In questo modo, le cellule che ricevono l'informazione fungono da fabbrica per la produzione della proteina che riesce ad essere poi raccolta anche dalle altre cellule, massimizzando così il numero di cellule che ricevono l'agente terapeutico e aumentando l'efficienza della terapia.

Per valutare l'efficacia di questo nuovo approccio rispetto ad uno classico, abbiamo valutato l'effetto del trattamento con la terapia genica innovativa sul modello murino della patologia CDKL5 confrontandolo con quello di una terapia genica classica. Comparando i risultati è emerso che a parità di efficacia di arrivo al sistema nervoso centrale, i topi trattati con il vettore con la proteina modificata hanno un maggiore numero di cellule cerebrali raggiunte dalla proteina CDKL5. Inoltre, questi topi hanno mostrato un miglioramento comportamentale e neuroanatomico rispetto ai topi di controllo o trattati con il vettore classico. Pertanto, con questo lavoro forniamo una prima prova che una terapia genica basata su un approccio di correzione incrociata è più efficace nel compensare i difetti cerebrali di topi Cdkl5 rispetto alla terapia genica basata sull'espressione della CDKL5 nativa. Questo studio apre la strada per lo sviluppo di questo approccio innovativo anche per altre malattie monogeniche.

Disease Name:

CDKL5 deficiency disorder

Nome malattia:

Malattia da deficit di CDKL5

Project number:

GGP19045

53. UNVEILING THE FUNCTIONAL ROLE OF CDKL5 AT THE INHIBITORY SYNAPSE THROUGH ITS INTERACTION WITH THE CYTOPLASMATIC COLLYBISTIN-GEPHYRIN COMPLEX

De Rosa R.*, Valastro S., Lora C., Randi S., Barbiero I., Baldin S., Carmone C., Kilstrup--Nielsen C.

Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria ~ Busto Arsizio ~ Italy

Mutations in the cyclin-dependent kinase-like 5 gene (CDKL5) have been found in patients with a rare X-linked epileptic encephalopathy, CDKL5 deficiency disorder (CDD), characterised by early-onset drug-resistant seizures, severe intellectual disability, and autistic-like features. No cure exists for CDD patients and the development of rationally designed drug-based therapies is still challenging due to the limited knowledge of CDKL5 functions.

A further understanding of the molecular network directly associated with CDKL5 is likely to provide

novel insights of how CDKL5 loss impacts neuronal functions. Most studies converge on a role of CDKL5 in regulating excitatory neurotransmission. Conversely, its role at the inhibitory synapse has been rather neglected until now. Our recent data show that CDKL5 de facto resides in the postsynaptic inhibitory synapse where it interacts with both collybistin and gephyrin, in vitro as well as ex vivo. Gephyrin is a scaffolding protein essential for the clustering of GABAA receptors at the postsynaptic site, while collybistin is a brain specific GEF regulating the submembrane distribution of gephyrin. Collybistin is known to alternate between a folded inactive conformation and an open extended one, the latter being induced upon interaction with other proteins.

Through biochemical and immunofluorescence experiments, we have found that CDKL5 is capable of activating collybistin thus promoting the submembrane distribution of gephyrin. Interestingly, the catalytic activity of CDKL5 appears to play a role in the distribution of gephyrin beneath the plasma membrane. Importantly, our biochemical and electrophysiological results corroborated the above data, showing that the GABAergic synapse is altered in the absence of CDKL5. From a pharmacological standpoint, this novel role may pave the way for disease-modifying drug-based therapies that could bypass the need of CDKL5.

Alla Scoperta del Ruolo Funzionale di CDKL5 nella Sinapsi Inibitoria attraverso lo Studio della sua Interazione con il Complesso Citoplasmatico costituito da Collybistin e Gephyrin

Mutazioni nel gene CDKL5, situato sul cromosoma X, sono state riscontrate in pazienti affetti da una rara malattia del neurosviluppo chiamata disordine da deficit di CDKL5 (CDD). Questo disordine si manifesta durante le prime settimane di vita con crisi epilettiche farmaco-resistenti, grave disabilità intellettiva e motoria. Ad oggi, non esiste alcuna cura per i pazienti affetti da CDD e lo sviluppo di terapie farmacologiche mirate è reso difficile a causa della conoscenza limitata delle funzioni del CDKL5.

Conoscere la rete molecolare in cui opera CDKL5 è utile per capire come la mancanza di CDKL5 possa influire sulle funzioni neuronali. La maggior parte degli studi convergono sul ruolo del CDKL5 nella regolazione della neurotrasmissione eccitatoria, mentre il suo ruolo nella sinapsi inibitoria è stato finora trascurato. Di recente, i nostri studi sia nelle cellule sia nel topo mostrano che, in realtà, CDKL5 si trova anche nella sinapsi inibitoria dove interagisce con collybistin e gephyrin. Quest'ultima è una proteina cruciale per la stabilizzazione dei recettori di tipo A del GABA a livello della membrana cellulare, mentre collybistin regola la distribuzione di gephyrin sotto la membrana. Collybistin si alterna tra una conformazione chiusa o inattiva ed una estesa o attiva e tale attivazione è regolata dalla sua interazione con altre proteine.

Mediante esperimenti biochimici e di immunofluorescenza, abbiamo dimostrato che CDKL5 è in grado di attivare collybistin promuovendo così la distribuzione di gephyrin sotto la membrana plasmatica. È interessante notare che l'attività catalitica di CDKL5 sembra svolgere un ruolo nella distribuzione di gephyrin. Inoltre, i nostri risultati biochimici ed elettrofisiologici hanno confermato i dati di cui sopra, dimostrando che la sinapsi GABAergica è alterata in assenza di CDKL5. Da un punto di vista farmacologico, questo nuovo ruolo di CDKL5 potrebbe aprire la strada a terapie farmacologiche mirate che potrebbero aggirare la mancanza di CDKL5.

Disease Name:

CDKL5 deficiency disorder

Nome malattia:

Malattia da deficit di CDKL5

Project number:

GGP20024

54. CHARACTERIZATION OF THE GUT MICROBIOTA IN CDKL5 DEFICIENCY DISORDER TO REVEAL NOVEL BIOMARKERS AND THERAPEUTIC STRATEGIES

Xynomilakis O.^[1], Damiani F.^[2], Ottaviano E.^[3], Putignano E.^[4], Cornuti S.^[2], Tognozzi A.^[1], Pizzorusso T.^[2], Vignoli A.^[3], Borghi E.^[3], Tognini P.*^[1]

^[1]Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[2]Laboratory of Biology, Scuola Normale Superiore ~ Pisa ~ Italy, ^[3]Department of Health Sciences, University of Milan ~ Milan ~ Italy, ^[4]Institute of Neuroscience, National Research Council ~ Pisa ~ Italy

CDKL5 deficiency disorder (CDD) is a neurodevelopmental disorder caused by mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 CDKL5 gene. It leads to severe early-onset epileptic encephalopathy, intellectual disability, visual impairment, gross motor impairment, hypotonia, sleep disturbances, and hand stereotype. While some symptoms are similar to Rett Syndrome (RTT), CDD is distinguished by the lack of a regression period and early onset seizures. Currently, no treatments are available for CDD.

CDD kids often display gastrointestinal symptoms and subclinical immune dysregulation as comorbidity. Those disturbances are sometimes linked to the intestinal microbiota. Notably, studies in rodents have shown the connection between gut microorganisms and brain function and behavior, especially in the context of neurological disorders, such as autism. Since the link between gut microbiota and neurological deficits has never been considered in CDD, we performed a comprehensive exploration of the gut microbiota composition in CDKL5 patients and mouse models. Our data demonstrated changes in diversity and composition of the gut microbes in CDD patients with respect to their healthy siblings. It is worth noting that alterations in richness and composition of the gut bacteria were observed also in mouse models confirming the validity and the importance of preclinical studies in CDD. Finally, antibiotic treatment in CDD mice ameliorated part of the behavioral impairments.

Our data reinforce the hypothesis of gut dysbiosis as a player in gastrointestinal abnormalities and potentially in neurological symptoms in CDD, opening the possibility to identify novel noninvasive biomarkers, and to target the gut microbiota through diet, probiotics or antibiotics to ameliorate the quality of life for our patients and their families.

Studio del microbiota intestinale nei pazienti con disturbo da deficit di CDKL5 per rivelare nuovi biomarcatori e strategie terapeutiche

La sindrome da deficit di CDKL5 (CDD) è una rara malattia neurologica di tipo genetico causata da mutazioni nel gene CDKL5. La patologia si manifesta nelle prime settimane di vita con crisi epilettiche farmacoresistenti. Inoltre, i pazienti mostrano grave disabilità motoria e intellettiva. A oggi, non esiste cura.

Spesso i pazienti hanno problemi di tipo gastro-intestinale. Tali disturbi sono talvolta legati al microbiota intestinale, la popolazione di microbi che vive nel nostro intestino. Studi recenti hanno evidenziato l'esistenza di vie di comunicazione tra il microbiota intestinale e il nostro cervello, suggerendo che i segnali provenienti dai microrganismi intestinali possano essere coinvolti nelle funzioni del sistema nervoso e nel comportamento. Inoltre, il microbiota sembra svolgere un ruolo importante in varie malattie neurologiche, tra cui l'autismo.

Poiché il legame tra microbiota intestinale e CDD non è mai stato esplorato, abbiamo studiato la composizione del microbiota nei pazienti e nei modelli murini. I nostri dati dimostrano cambiamenti nella composizione dei microbi intestinali nei pazienti CDD rispetto alle loro sorelle e fratelli sani. Poiché nel modello animale abbiamo osservato alterazioni simili, il topo è stato trattato con antibiotici e sottoposto a diversi tipi di test.

I nostri dati suggeriscono che il microbiota possa potenzialmente giocare un ruolo nelle anomalie gastrointestinali e nei sintomi neurologici della CDD. Questi risultati potrebbero aiutare a identificare biomarcatori non invasivi, e scoprire nuove strategie terapeutiche atte a manipolare il

microbiota intestinale per migliorare alcuni sintomi della CDD.

Disease Name:

CDKL5 deficiency disorder

Nome malattia:

Malattia da deficit di CDKL5

Project number:

GSP21001

55. INTEGRATED COMPUTATIONAL AND EXPERIMENTAL APPROACHES TO DRUG REPOSITIONING FOR RARE GENETIC DISORDERS

Di Bernardo D., Criscuolo S.*, Failli M., De Cegli R.

TIGEM ~ Napoli ~ Italy

Drug repurposing aims at finding a new therapeutic application of a drug already approved in clinics but for a different purpose. We developed three computational approaches for drug repurposing based on the analysis of transcriptional responses to drug treatment: Gene2Drug2 (<http://gene2drug.tigem.it>), Mode of Action by Network Analysis (<http://mantra.tigem.it>) and Drug Set Enrichment Analysis (<http://dsea.tigem.it>). Gene2Drug identifies drugs to repurpose according to their ability to transcriptionally modulate genes belonging to a set of known disease-relevant pathways. Mantra is based on the hypothesis that if a drug induces a transcriptional response opposite to the one caused by the disease, then that drug might be potentially therapeutic. DSEA analyses the transcriptional response of hit compounds from screening studies to detect those molecular pathways that are consistently up- or down- regulated by most of the compounds, thus helping to elucidate their mechanism of action.

In this project, we aim at repositioning drugs for the treatment of rare genetic disorders, including CDKL5 Deficiency Disorder (CDD) using computational approaches to sift through thousands of drugs and select the most promising ones and to experimentally validate them. Cyclin-dependent kinase-like 5 disorder (CDD) represents a severe developmental encephalopathy caused by pathological mutations in the cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) transcript (OMIM 300203, 300672). No disease-modifying treatments have been identified, in part because of the incomplete knowledge of CDKL5 function. The project consists of three Specific Aims: AIM 1 Identification of putative drugs based on the analysis of CDKL5 functional interactors. We will perform an in silico study to establish CDKL5 functional interactors starting from publicly available databases of physical interactions to obtain a set of genes and pathways functionally related to CDKL5. The resulting set of genes, including CDKL5 functional interactors will be given in input to the Gene2Drug tool to generate a list of compounds able to transcriptionally modulate these genes, and thus potentially bypassing CDKL5 deficiency. AIM 2: Identification of putative compounds able to reverse the CDD gene signature. Two relevant human cell lines will be edited by deletion of CDKL5 and will be transcriptionally profiled to obtain a list of differentially expressed genes (DEGs) against wild-type controls. DEGs will be analysed to identify dysregulated pathways and then given as input to the MANTRA tool to search for FDA approved drugs and research compounds able to reverse the DEGs and thus making CDKL5 KO cells more transcriptionally similar to their WT counterparts, and thus potentially reversing or ameliorating the CDKL5 deficiency. AIM 3 Experimental Validation. The list of candidate drugs from AIM1 and AIM2 will be experimentally and functionally validated in cell lines and in ex vivo cortical neurons in mice.

APPROCCI INTEGRATI COMPUTAZIONALI E SPERIMENTALI PER IL RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI PER LE MALATTIE GENETICHE RARE

Disease Name:

CDKL5 deficiency disorder

Nome malattia:

Malattia da deficit di CDKL5

Project number:

TGM22GM05

56. PCDH19-RELATED NEURODEVELOPMENTAL SYNDROME: UNRAVELING THE PLAYERS OF NEURONAL HYPEREXCITABILITY IN SEARCH OF NEW THERAPEUTIC TARGETS

Mazzoleni S.^[1], Busnelli M.^[1], Piazza R.G.^[2], Bassani S.^[1]

^[1]Institute of Neuroscience, CNR ~ Veduggio al Lambro ~ Italy, ^[2]Dept. of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca ~ Milano ~ Italy

Developmental and Epileptic Encephalopathy 9 (DEE9, OMIM # 300088) is a debilitating neurological condition with no effective cure, characterized by early-onset seizures, intellectual disability and autism. DEE9 is due to mutations in the X-chromosome gene PCDH19 that encodes protocadherin-19 (PCDH19), a calcium dependent cell-cell adhesion molecule.

We recently reported that PCDH19 undergoes an activity-dependent proteolytic cleavage that generates a cytosolic C-terminal fragment (CTF), which goes in the nucleus and regulates immediate-early genes expression in primary hippocampal neurons.

The aim of this project is to study the role of PCDH19 on gene expression regulation in vivo in both physiological and pathological conditions and identify potential therapeutic targets for DEE9.

To this end, we are exploiting the new conditional knock-out (cKO) mouse model for Pcdh19 that we recently generated through the Cre-LoxP system and that recapitulates key aspects of DEE9, including seizure susceptibility, cognitive deficits and autistic traits.

We are using two complementary approaches: (i) we are looking for genes regulated by PCDH19 at genome-wide and single-cell level in both male and female cKO mice and control littermates at different developmental stages via single-nucleus RNA-Seq (snRNA-Seq); (ii) among all deregulated genes we aim to identify primary PCDH19 target genes based on PCDH19 CTF association pattern with the chromatin.

In parallel, we are characterizing the oxytocin (OXT) system of Pcdh19 cKO mice. OXT is a promising treatment for neurodevelopmental disorders associated to autism and psychiatric features. Notably, it has been reported the OXT receptor (OXTR) expression is altered in primary skin fibroblasts of DEE9 patients, thus suggesting that OXTR might be one of the target genes of PCDH19. If defects in OXT system will emerge, mice will undergo intranasal OXT administration in attempt to ameliorate DEE9 symptoms.

By pursuing the aforementioned goals we expect to provide a novel key to understand DEE9 pathological mechanisms and to identify new therapeutic targets and strategies.

Mutazioni nel gene PCDH19 causano una patologia del neurosviluppo, nota come encefalopatia epilettica e dello sviluppo 9 (DEE9), che colpisce soprattutto le bambine ed è caratterizzata da epilessia, autismo e disabilità cognitive (Dibbens et al., 2008). PCDH19 codifica per la proteina protocaderina-19, che è normalmente espressa sulla superficie dei neuroni e permette loro di interagire e formare i circuiti. Tuttavia, abbiamo scoperto che la protocaderina-19 riveste anche un

ruolo inaspettato nel nucleo, dove è in grado di regolare l'espressione di alcuni geni importanti per l'eccitabilità neuronale e la plasticità sinaptica (Gerosa et al., 2022). Inoltre, è stato osservato che in alcune cellule cutanee dei pazienti affetti da DEE9 anche l'espressione del gene che codifica per il recettore dell'ossitocina è alterata (Tan et al., 2015). L'ossitocina è un neuropeptide importante per il comportamento cognitivo e sociale e rappresenta un trattamento promettente per i disturbi del neurosviluppo associati all'autismo e ai disturbi psichiatrici. Il nostro obiettivo è identificare, all'interno del genoma, tutti i geni regolati dalla protocaderina-19 e studiare il potenziale coinvolgimento del sistema dell'ossitocina nella patologia DEE9. A tal fine stiamo sfruttando un modello murino (il topo *Pcdh19* KO) e tecnologie innovative per individuare i geni regolati da protocaderina-19 nei diversi tipi di neuroni e nelle diverse fasi dello sviluppo cerebrale sia nei maschi che nelle femmine. Inoltre, stiamo studiando il sistema dell'ossitocina nel topo *Pcdh19* KO e, nel caso dovesse risultare difettoso, verificheremo l'efficacia del trattamento con ossitocina. Auspichiamo che questo progetto possa fornire una migliore comprensione della patologia e ci possa permettere di identificare nuovi bersagli e strategie terapeutiche per migliorare la condizione dei pazienti affetti da DEE9.

Disease Name:

Developmental and Epileptic Encephalopathy 9

Nome malattia:

Encefalopatia epilettica dello sviluppo 9

Project number:

GGP20056

57. TEMPORAL MANIPULATION OF SCN1A GENE EXPRESSION IN DRAVET SYNDROME

Salamone A.^[1], Valassina N.^[1], Brusco S.^[1], Di Bernardino C.^[1], Mainardi M.^[1], Becca M.V.^[2], Broccoli V.^[1], **Colasante G.*^[2]**

^[1]Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[2]Università Vita Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy

Dravet syndrome (DS) is a severe infantile epileptic encephalopathy, characterized by drug-resistant epilepsy, severe cognitive and behavioral deficits and a high risk of sudden unexpected death (SUDEP). In the 80% of cases, it is caused by haploinsufficiency of *SCN1A* gene, that encodes for the α subunit of the voltage-gated sodium channel Nav1.1.

Gene therapy is a promising treatment for DS but whether the reinstatement of physiological levels of Nav1.1 is sufficient to revert the pathology after symptom onset remains unknown. To address this question, we generated a *Scn1a* conditional knock-in mouse model (*Scn1a*Stop/+) in which *Scn1a* expression can be re-activated on-demand during the mouse lifetime¹. We showed that *Scn1a* gene re-activation when symptoms were already manifested (P30) led to a complete rescue of both spontaneous and thermic inducible seizures and a marked amelioration of behavioral abnormalities including social deficits, hyperactivity and cognitive impairment¹. We also identified dramatic gene expression alterations, including those associated with astrogliosis in Dravet syndrome mice, that, accordingly, were rescued by *Scn1a* gene expression normalization at P30. Interestingly, regaining of Nav1.1 physiological level rescued seizures also in adult Dravet syndrome mice (P90) ¹. Overall, these findings represent a solid proof-of-concept highlighting that disease phenotype reversibility can be achieved when *Scn1a* gene activity is efficiently reconstituted in brain cells.

In a therapeutic perspective, it would be important to determine whether *Scn1a* is also required after a critical developmental time-window or whether ensuring physiological levels of Nav1.1

during early post-natal life is sufficient to prevent or mitigate DS symptoms.

To achieve temporal control of Scn1a gene expression, we crossed a conditional model of DS carrying a missense mutation in the coding sequence (floxed stop Scn1a*A1783V) with UBC-Cre-ERT2 mice. By tamoxifen injections, we induced the expression of Scn1a mutant allele at two different post-natal time points, P30 and P60 and compared their phenotypes to those of perinatally (P2) inactivated mice (Dravet model). P30- and P60-inactivated mice show a mortality rate for SUDEP comparable to Dravet mice and video-EEG analysis detected the occurrence of spontaneous seizures. When tested for behavioral alterations, P30- and P60-inactivated mice revealed to be anxious and hyperactive and display impairment in social memory similarly to Dravet mice. Interestingly, in the water maze test, they showed to be more skilled in comparison to Dravet mice. Our data show that the maintenance of physiological levels of Nav1.1 until P30 and P60 is not sufficient to prevent DS symptoms but ameliorated cognitive performance. These data suggest that continuous administration of any treatment aiming to increase levels of Scn1a gene is required as also late induction of Scn1a gene haploinsufficiency manifest in DS phenotype.

La sindrome di Dravet (DS) è una grave encefalopatia epilettica infantile, caratterizzata da epilessia resistente ai farmaci, gravi deficit cognitivi e comportamentali e un alto rischio di morte improvvisa inaspettata (SUDEP). Nell'80% dei casi è causata dall'aploinsufficienza del gene SCN1A, che codifica per la subunità α del canale del sodio voltaggio-dipendente Nav1.1.

La terapia genica è un trattamento promettente per la SD, ma non è chiara la sua efficacia dopo l'insorgenza dei sintomi. Per rispondere a questa domanda, abbiamo generato un nuovo modello di topo reversibile della SD in cui l'espressione Scn1a può essere riattivata su richiesta durante la vita. Abbiamo dimostrato che la riattivazione del gene Scn1a quando i sintomi erano già manifestati (P30) ha portato a un completo recupero di crisi inducibili sia spontanee che termiche e un marcato miglioramento delle anomalie comportamentali tra cui deficit sociali, e cognitivi. Nel complesso, questi risultati rappresentano una solida prova di concetto che evidenzia che la reversibilità del fenotipo della malattia può essere raggiunta quando l'attività del gene Scn1a viene ricostituita in modo efficiente in cellule cerebrali.

In una prospettiva terapeutica, sarebbe importante determinare se Scn1a è richiesto anche dopo una finestra temporale di sviluppo critica o se garantire livelli fisiologici di Nav1.1 durante la prima vita postnatale è sufficiente per prevenire o mitigare i sintomi della DS.

Per ottenere il controllo temporale dell'espressione del gene Scn1a, generato un nuovo modello murino in cui l'aploinsufficienza del gene può essere indotta a tempi diversi. Mediante iniezioni di tamoxifene, abbiamo indotto l'espressione dell'allele mutante Scn1a a due diverse età (P), P30 e P60 e abbiamo confrontato i loro fenotipi con quelli di classici animali Dravet. I topi inattivati a P30 e P60 presentano crisi epilettiche e mostrano un tasso di mortalità, livelli di ansia, iperattività e disturbi sociali confrontabili ai topi Dravet. Nei test cognitivi, mostrano maggiore abilità rispetto ai topi Dravet. I nostri dati mostrano che il mantenimento dei livelli fisiologici di Nav1.1 fino a P30 e P60 non è sufficiente a prevenire i sintomi della DS ma migliora le prestazioni cognitive. Questi dati suggeriscono che è necessaria la somministrazione continua di qualsiasi trattamento mirato ad aumentare i livelli del gene Scn1a poiché anche l'induzione tardiva dell'aploinsufficienza del gene Scn1a si manifesta nel fenotipo DS.

Disease Name:

Dravet Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Dravet

Project number:

GGP19249

58. NANOBODY-MEDIATED MODULATION OF HCN1 CHANNELS IN EPILEPTIC DISORDERS

Castelli R.*, Sharifzadeh A.S., Leone R., Giannini G.C., Porro A., Saponaro A., Moroni A.

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI MILANO ~ MILANO ~ Italy

NANOBODY-MEDIATED MODULATION OF HCN1 CHANNELS IN EPILEPTIC DISORDERS

Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated 1 (HCN1) channels contribute to the cationic I_h current in neurons and are involved in the control of neuronal excitability[. Several mutations in the HCN1 gene have been correlated with the insurgence of Early Infantile Epileptic Encephalopathy (EIEE), a severe form of epilepsy characterized by recurrent seizures with impaired cognitive and motor development with onset in the first year of life, that doesn't have a targeted treatment yet. In search of modulators that can reduce, and possibly abolish, HCN1-related phenotypes, nanobodies (NBs) represents a future therapeutic tool with great potential. By screening a synthetic library, we have isolated several nanobodies that specifically target HCN channel subtypes. We show here that nanobody #5 is able to revert the phenotype, 8mV right shift in voltage-dependency, caused by the pathogenic R548H mutation of the hHCN1 channel. Notably, the nanobody acts from the extracellular side of the channel presumably binding to the voltage sensor, while the mutation, previously characterized, affects cAMP binding to the intracellular Cyclic Nucleotide Binding Domain (CNBD) of the channel. This result opens valuable therapeutical perspectives for EIEE patients and further highlights that in HCN channels voltage sensing at the membrane and ligand binding at the cytosolic domain are mutually interconnected.

Nuove prospettive terapeutiche per i pazienti EIEE con mutazioni in HCN1, basate su nanobody che legano il canale.

I canali ionici HCN1 contribuiscono alla corrente cationica I_h nei neuroni e sono coinvolti nel controllo dell'eccitabilità neuronale. Diverse mutazioni nel gene HCN1 sono state correlate all'insorgenza dell'Encefalopatia Epilettica Precoce Infantile (EIEE), una grave forma di epilessia caratterizzata da crisi ricorrenti con compromissione dello sviluppo cognitivo e motorio con esordio nel primo anno di vita. I nanobodies (NB) rappresentano uno strumento terapeutico dal grande potenziale in quanto possono legarsi al canale modificandone l'attività e/o possibilmente abolendola in modo da mitigare l'effetto delle mutazioni. Dopo aver isolato da una libreria sintetica diversi nanobodies che riconoscono specificamente i canali HCN, abbiamo dimostrato che il nanobody #5 è in grado di invertire il fenotipo, lo spostamento di 8mV della curva di attivazione, causato dalla mutazione patologica R548H del canale hHCN1. In particolare, il nanobody agisce dal lato extracellulare del canale legandosi presumibilmente al sensore di voltaggio, mentre la mutazione, precedentemente caratterizzata, influisce sul legame del ligando cAMP al dominio intracellulare (CNBD) del canale. Questo risultato apre preziose prospettive terapeutiche per i pazienti affetti da EIEE e sottolinea ulteriormente che nei canali HCN il rilevamento del voltaggio a livello della membrana e il legame con il ligando nel dominio citosolico sono funzionalmente interconnessi.

Disease Name:

Early infantile epileptic encephalopathy, undetermined

Nome malattia:

Encefalopatia epilettica a esordio precoce non specificata

Project number:

GGP20021

59. NOVEL INSIGHTS ON CHLORIDE REGULATIONS: IMPLICATION FOR DISEASE ETIOLOGY AND TREATMENT

Marika A.^[1], Brondi M.^[2], Di Soccio A.^[3], Garavaldi T.^[4], Landi S.^[5], Nardi G.^[4], Pasquini G.^[4], Pracucci E.^[4], Lodovichi C.*^[3], Ratto G.M.^[4]

^[1]Veneto Institute of Molecular Medicine, Padova Neuroscience Center – UNIPD ~ Padova ~ Italy, ^[2]Veneto Institute of Molecular Medicine, Padova. IN-CNR, Padova. ~ Padova ~ Italy, ^[3]Veneto Institute of Molecular Medicine, Padova. IN-CNR, Padova. Padova Neuroscience Center – UNIPD. ~ Padova ~ Italy, ^[4]NANO-CNR and Scuola Normale Superiore, Pisa. ~ Pisa ~ Italy, ^[5]IN-CNR, Pisa ~ Pisa ~ Italy

The importance of the excitatory/inhibitory balance in neuronal circuits emerges from studies on pathological conditions, which indicate 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 (1,2). A growing body of evidence indicates that alterations in development of inhibitory interneurons play a prominent role in the etiopathogenesis of neurodevelopmental disorders. Inhibition is also dependent on the electrochemical gradient of Chloride (Cl⁻) since this is the main ion flowing through the GABA ionotropic receptor. The importance of the regulation of intracellular chloride ([Cl⁻]_i) in neurodevelopmental disorders is widely recognized (3,4).

In previous studies we found that in transgenic mice carrying a null mutation in oligophrenin1 (OPHN1) (4,5), a X-linked gene associated to intellectual disability (ID) and autism spectrum disorders (ASD) in humans (6), the development and migration of forebrain GABAergic inhibitory interneurons are deeply altered. In these mice, we dissected the impact of OPHN1 mutation at system levels, by studying behavior, neuronal circuit activity and dynamics by means of electrophysiological and multiphoton imaging in vivo. We address this topic in the olfactory bulb and connected brain areas, since olfaction allows to investigate both sensory and cognitive process, which are both altered in ID-ASD. Our data indicate that both olfactory behavior and networks dynamics are deeply altered in OPHN1 mutant mice. Noteworthy, GABAergic inhibitory interneurons presented an abnormal development and response polarity in OPHN1 KO mice due to altered homeostasis of [Cl⁻]_i. GABA response polarity is not univocal but critically depends on [Cl⁻]_i which is regulated by passive fluxes through Cl⁻-permeable channels and by Cl⁻ cotransporters.

Our scarce understanding of Cl⁻ regulation is underlined by our recent discovery, obtained by in vivo 2-photon imaging (7), that [Cl⁻]_i in pyramidal neurons follows a diurnal change with high [Cl⁻]_i when mice are awake (night), relative to when they are mostly asleep (midday) (8). Importantly, the Cl⁻ cycle occurs in counterphase with mTOR activity and protein synthesis. The diurnal cycle of [Cl⁻]_i determines a modulation of the inhibitory feedback in the cortex as witnessed by changes in visually driven gamma oscillations between day and night. Furthermore, we observed that the [Cl⁻]_i cycle determines a greater susceptibility to epileptic seizures at night, compared to midday (7). We expect that these data will help understanding the complex and largely mysterious circadian dependency of most psychiatric and neurological manifestations. Our new data show that [Cl⁻]_i regulation is a complex phenomenon intertwined with circadian rhythm and mTOR-driven protein translation. We expect that this novel link between circadian mechanisms, proteostasis and neuronal excitability, might offer novel treatable pathways.

L'equilibrio dinamico tra eccitazione ed inibizione è uno degli elementi chiave del funzionamento del cervello e la rottura di questo bilanciamento è alla base della maggior parte delle patologie cognitive (1,2). Questa perturbazione può avvenire per difetti genetici che portano ad un disturbo dello sviluppo dei neuroni inibitori oppure può dipendere da fattori legati alla regolazione del cloro intracellulare (Cl⁻) dato che l'ingresso di questo ione attraverso le sinapsi inibitorie è alla base della inibizione veloce. Il flusso del Cl⁻ è determinato dalla sua concentrazione intracellulare ([Cl⁻]_i) e infatti la sua regolazione è un elemento di grande importanza fisiopatologica (3,4).

In studi precedenti abbiamo scoperto che in topi transgenici che mancano della oligofrenina1 (OPHN1) (4,5), un gene posto sul cromosoma X associato a disabilità intellettuali e a segni propri delle malattie dello spettro autistico (ASD) (6), lo sviluppo e migrazione dei neuroni inibitori è profondamente alterata. In questi topi abbiamo studiato l'impatto della perdita del gene, mediante elettrofisiologia ed imaging a due fotoni, nel bulbo olfattivo e nelle aree connesse. In queste aree, OPHN1 è normalmente fortemente espresso e il sistema olfattivo permette di studiare sia le funzioni sensoriali che processi cognitivi che sono affetti in ID-ASD. I nostri dati indicano che lo sviluppo degli interneuroni inibitori è anormale e che la direzione delle correnti cloro è alterata causa di difetti della regolazione del [Cl⁻]_i.

La dimostrazione che sappiamo ancora poco dei processi alla base della regolazione del [Cl⁻]_i è data dalla nostra recente scoperta della esistenza di un ritmo diurno nella sua regolazione. Mediante imaging quantitativo a due fotoni (7), abbiamo scoperto che nelle cellule piramidali della corteccia visiva del topo, il [Cl⁻]_i varia di quasi un fattore due, con il minimo durante il giorno, in corrispondenza del periodo di sonno, ed un massimo di notte, durante il picco di attività (8). Questa regolazione ciclica è in controfase con l'attività di mTOR, una proteina fondamentale per il controllo della sintesi proteica. Il ciclo del cloro causa una modulazione della funzione della corteccia visiva. Inoltre, la riduzione della inibizione causata dall'alto cloro notturno aumenta la suscettibilità della corteccia per l'induzione di attività epilettica.

Riteniamo che questi dati siano importanti per fornire una spiegazione alla nota, ma in gran parte misteriosa, dipendenza dall'orario del giorno di numerose manifestazioni psichiatriche e neurologiche. Qui dimostriamo che la regolazione del cloro è un fenomeno complesso intrecciato con la regolazione circadiana delle funzioni cellulari e della sintesi proteica, In prospettiva, questa scoperta potrebbe aprire la strada alla individuazione di nuove strategie terapeutiche dirette a regolarizzare il rapporto eccitazione/inibizione nel cervello.

Disease Name:

Epilepsy, Cognitive Deficits

Nome malattia:

Epilessia, difetti cognitivi

Project number:

GGP19281

60. RNA-BASED RESCUE OF INHIBITION AS POTENTIAL TREATMENT FOR GENETIC GABRA1-DEPENDENT EPILEPSY

Nencini S.*, Bruno M., Stefania G., Enrica P., Andrea B.

Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy

Specific forms of epileptic encephalopathies (EEs) have been associated to the haploinsufficiency of the GABRA1 gene that, by coding for the alpha1 subunit of the main inhibitory synaptic receptor, determines the loss-of-function of GABAergic inhibition. Therefore, the increase of GABRA1 expression is an obvious target for the treatment of GABRA1-dependent EEs.

A newly identified class of natural antisense long non-coding RNAs (SINEUPs) are able to overcome defective gene expression by promoting mRNA translation, thus offering a novel new scalable therapeutic tool to correct genetic disorders. Preliminary experiments in both HEK293T cells and primary cultured neurons where the haploinsufficiency was mimicked by shRNA,

allowed to identify SINEUPs that specifically rescued $\alpha 1$ -GABAAR expression.

Building on this preliminary validation, we further exploited GABRA1-SINEUPs to restore GABAergic inhibitory signaling in heterozygous $\alpha 1$ knock-out mice (het- $\alpha 1$ KO), a minimalistic model of GABRA1 haploinsufficiency with an epileptic phenotype associated with defective GABAergic inhibition.

In a first set of experiments, we recorded spontaneous GABAergic synaptic inhibitory currents (sIPSCs) in cultured cortical neurons from the haploinsufficient het- $\alpha 1$ KO mice, following infection with viral vector carrying the GABRA1-SINEUP and control experimental groups. We found that, in het- $\alpha 1$ KO mice, sIPSCs showed a higher decay time constant with respect to wild type, thus indicating the altered timing of synaptic inhibition in haploinsufficient het- $\alpha 1$ KO mice. Interestingly, SINEUP-GABRA1 specifically rescued such deficit in the IPSCs decay kinetics.

Next, we characterized the efficacy of GABRA1-SINEUP to rescue GABAergic transmission in cortical brain slices from juvenile (P35) het- $\alpha 1$ KO mice. SINEUP-ctrl or SINEUP-GABRA1 were transduced in cortical neurons following viral injection at P21 in the primary somatosensory cortex (S1), a brain area that has been shown to initiate cortico-thalamic bursting activity loops which is typically linked to absence seizures. In line with the results obtained in neuronal cortical cultures, SINEUPs restored the decay time of inhibitory currents in het- $\alpha 1$ KO mice, by bringing the values of the decay time constant in haploinsufficient mice to those observed in wild type.

Overall, these results indicate the SINEUP technology has the potential to reduce seizures in GABRA1-dependent EEs thus representing a strong candidate to address a wide range of severe and untreatable genetic epilepsies.

Ripristino dell'inibizione sinaptica mediante "non-coding RNA" come terapia delle epilessie genetiche con mutazioni in GABRA1

Un ampio spettro di epilessie di origine genetica è associato a mutazioni a carico di GABRA1, un gene che codifica per la subunità $\alpha 1$ del recettore GABA_A e che ricopre un ruolo fondamentale nel mediare l'inibizione nel cervello. Mutazioni su GABRA1 inducono la perdita della funzione inibitoria del recettore GABA_A rappresentando quindi una possibile causa di scariche epilettiche. In tali condizioni, una naturale strategia di intervento in soggetti con mutazioni su GABRA1 sarebbe di incrementare l'espressione di $\alpha 1$, al fine di restaurare il corretto livello di inibizione e revertire il fenotipo epilettico. In questo progetto abbiamo seguito tale strategia terapeutica, sfruttando la tecnologia SINEUP che consiste nell'utilizzo di molecole di RNA capaci di incrementare l'espressione di specifici geni bersaglio. Abbiamo già identificato delle SINEUPs che aumentano l'espressione di $\alpha 1$ (SINEUP-GABRA1). Al fine di validare in fase pre-clinica l'uso di SINEUP-GABRA1 per il trattamento delle forme di epilessia dipendenti dalle mutazioni sul gene GABRA1, ci siamo avvalsi di topi epilettici deficitari di GABRA1. In questo modello preclinico di epilessia, abbiamo quindi studiato la capacità di SINEUP-GABRA1 di recuperare il tono inibitorio nella regione corticale somatosensoriale primaria, una delle principali regioni cerebrali coinvolte nell'iniziazione delle scariche epilettiche (crisi di assenza). Tale validazione di SINEUP-GABRA1 in modelli animali ci permette di proporre la strategia SINEUP come una terapia innovativa, versatile e personalizzata per trattare diversi tipi di epilessia incluso gravi encefalopatie epilettiche per le quali ad oggi non esistono trattamenti efficaci.

Disease Name:

Epilepsy, GABRA1-dependent

Nome malattia:

Epilessia dovuta a mutazioni di GABRA-1

Project number:

GGP20129

61. CURE MERRF: FROM FIBROBLASTS TO ORGANOIDS SPEEDING BASIC SCIENCE INTO CLINICAL TRIALS FOR MITOCHONDRIAL DISEASES

Maresca A.*^[1], Capirossi G.^[2], Capristo M.^[1], Del Dotto V.^[2], Sacchetti G.^[1], Tropeano C.V.^[1], Pisano A.^[3], Giordano C.^[3], D'Amati G.^[3], Carelli V.^[1]

^[1]IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna ~ Bologna ~ Italy, ^[2]Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna ~ Bologna ~ Italy, ^[3]Department of Radiological Sciences, Oncology and Anatomical Pathology, Sapienza University ~ Roma ~ Italy

Myoclonus, Epilepsy and Ragged-Red-Fibers (MERRF) is a mitochondrial encephalomyopathy due to heteroplasmic mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) most frequently affecting the tRNA^{Lys} gene at position m.8344A > G. Defective tRNA^{Lys} severely impairs mitochondrial protein synthesis and respiratory chain when a high percentage of mutant heteroplasmy crosses the threshold for full-blown clinical phenotype. Therapy is currently limited to symptomatic management of myoclonic epilepsy, and supportive measures to counteract muscle weakness with co-factors/supplements.

The aim of the "Cure MERRF" project is to test therapeutic approaches in neuronal models derived from patients, i. e. induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)-derived neuronal precursors, differentiated neurons and 3D brain organoids.

We first demonstrated in patient fibroblasts that induction of mitochondrial biogenesis, pharmacologically (niacin) or genetically (PGC1- α overexpression) is not sufficient to rescue mitochondrial dysfunction in MERRF cells with high-mutation load. On the contrary, mTORC1 inhibition through a prolonged low-dose rapamycin treatment was efficient in rescuing the energetic defect in both intermediate and high-mutation loads. Thus, rapamycin is a good candidate to be tested in models targeted by MERRF disease.

To this aim, starting from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), we generated iPSCs from two control individuals and two different patients carrying the m.8344 mutation and we checked these cells for pluripotency, nuclear and mitochondrial integrity, and m.8344 heteroplasmy. Unfortunately, for one MERRF patient we obtained only wild type mtDNA iPSCs clones. For the second MERRF patient, we generated 3 clones with different heteroplasmy (2%, 18%, 45% of mutant load) and a wild type syngeneic clone. Lastly, we obtained a third iPSCs clone carrying the m.8344 mutation (30% of mutant load) from Prof. Giulia d'Amati. We are currently developing cortical brain organoids from this latter clone, which will be analyzed at days 70-90 through histoenzymatic, genetic and bioenergetic analyses. Next, this model will be used to test rapamycin as first repurposing strategy.

Curare la sindrome MERRF: dai fibroblasti agli organoidi per accelerare la transizione dalla scienza di base ai trial clinici nelle malattie mitocondriali.

Le malattie determinate da mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) sono individualmente rare, ma complessivamente sono le più frequenti malattie genetiche nell'uomo. Possono colpire sia l'infanzia che gli adulti, andando da forme lievi mono-sintomatiche, che portano a cecità o sordità, a forme devastanti che portano a morte. Dopo 30 anni di studio, sono ora disponibili delle potenziali terapie, tuttavia il maggiore ostacolo per la loro sperimentazione umana rimane l'incapacità di generare modelli animali, a causa delle peculiarità del mtDNA.

Questo progetto ha l'ambizione di generare e validare un nuovo modello di malattia, usando la tecnologia innovativa che permette la riprogrammazione di cellule staminali pluripotenti (hiPSCs) dai pazienti, e quindi sviluppare in coltura neuroni e organi miniaturizzati, gli stessi malati nel paziente vivente. Questi mini-organismi riproducono le manifestazioni della malattia, permettendo di

definire i meccanismi che portano al fenotipo clinico, e in definitiva di sperimentare le terapie. Ci sono due vantaggi principali con questo approccio: primo, viene oltrepassata la difficoltà di generare modelli animali per le malattie associate a mutazioni del mtDNA, secondo, la terapia viene ritagliata sul paziente individuale (medicina personalizzata).

La malattia che affrontiamo in questo progetto è la sindrome Miocloni, Epilessia, Fibre-Stracciate-Rosse, anche nota come sindrome MERRF, un paradigma per le cosiddette encefalomiopatie mitocondriali. Sperimentiamo sia la rapamicina, farmaco già approvato per l'uso nell'uomo, che molecole nuove, e la terapia genica.

Per quanto riguarda la rapamicina, abbiamo già ottenuto risultati promettenti nei fibroblasti cutanei di pazienti affetti da sindrome MERRF, ottenendo un notevole miglioramento delle funzionalità energetiche. Abbiamo inoltre ottenuto iPSCs da due individui di controllo e da tre differenti pazienti MERRF e stiamo attualmente sviluppando i mini-organi cerebrali, che verranno studiati e su cui saranno testate le tre terapie previste.

Disease Name:

MERF

Nome malattia:

MERF

Project number:

GGP20115

62. INTERACTION OF PRRT2 WITH NA⁺ CHANNELS: PATHOGENETIC BASIS AND NEW TARGETS FOR THE CURE OF PRRT2-ASSOCIATED PAROXYSMAL DISORDERS

Franchi F., Sterlini B., Corradi B., Alberini G., Ravasenga T., Romei A., Michetti C., Maragliano L., Baldelli P., Corradi A., Valente P., Benfenati F.*

University of Genova and Istituto Italiano di Tecnologia ~ 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⁺ 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.

Disease Name:

Paroxysmal kinesigenic dyskinesia

Nome malattia:

Discinesia parossistica kinesigenica

Project number:

GGP19120

Genetic neurological disorder\Intellectual Disabilities

63. PERINATAL OXYTOCIN AMELIORATES BEHAVIORAL AND IMMUNOLOGICAL TRAJECTORIES IN 22Q11.2 DELETION SYNDROME MICE CLOSING BRAIN BARRIERS

Castellani G.^[1], Ciampoli M.^[1], Chini B.^[2], Papaleo F.*^[1]

^[1]Genetics of Cognition, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy, ^[2]CNR Institute of Neuroscience ~ Milano ~ Italy

Genetic vulnerability and immunological alterations are associated with the development of psychiatric disorders. However, it is unknown how risk genes impact on the immune system profiling, and if their interconnections can be targeted to improve aberrant behavioral trajectories. Here, we focused on the 22q11.2 hemideletion, a well-established genetic predisposition factor to psychiatric disorders. By developmentally characterizing 22q11.2 hemideleted mice (LgDel/+), we revealed adolescence as a turning point for behavioral and cortical abnormalities, associated with immunological alterations. Oxytocin (OXT) perinatal intranasal supplementation led to long-lasting behavioral and immunological ameliorations in LgDel/+ mice which have reduced endogenous OXT. These effects were primarily related to OXT-dependent long-lasting closure of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers, but not on microglia or circulating regulatory T cells mechanisms. Our findings shed new light on the complex interaction between genetic risk, altered immune system and consequent abnormal behavioral development, providing a roadmap for therapeutic approaches.

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

Il nostro progetto si propone di investigare i possibili effetti positivi di un trattamento con il neuropeptide ossitocina (OXT) sui deficit sociali, cognitivi e del sistema immunitario che caratterizzano la sindrome da microdelezione 22q11.2 (22q11.2DS), che rappresenta il più comune fattore di rischio per l'esordio precoce di schizofrenia. Il nostro principale scopo è quindi stabilire se l'ossitocina possa rappresentare una nuova strategia terapeutica per migliorare lo sviluppo delle funzionalità cognitive, sociali ed immunologiche nella sindrome 22q11.2DS. Allo stesso tempo ci prefiggiamo di fornire nuove conoscenze sugli effetti neuroimmunomodulatori dell'ossitocina. In particolare, caratterizzeremo in dettaglio l'impatto dell'esposizione all'ossitocina nel modello murino di 22q11.2DS LgDel/+ sia da un punto di vista comportamentale che delle connessioni tra cervello e sistema immunitario. Dei nostri esperimenti preliminari suggeriscono infatti che l'esposizione con OXT possa migliorare lo sviluppo di alcune funzioni sociali e del sistema immunitario in questo modello murino. 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. A questo scopo useremo test comportamentali con comprovata translabilità nell'uomo, nonché una serie di valutazioni approfondite della funzionalità del sistema immunitario a livello periferico e del cervello. Successivamente, per identificare i meccanismi immunomodulatori dell'OXT, manipoleremo in maniera selettiva componenti del sistema immunitario a livello periferico o del cervello. Il progetto, coordinato dal Dr. Francesco Papaleo, direttore del Genetics of Cognition Laboratory all' Istituto Italiano di Tecnologia di Genova, verrà condotto in partenariato con il gruppo della Dr. Bice Chini all'Istituto di Neuroscienze del CNR di Milano.

Disease Name:

22q11.2 deletion syndrome

Nome malattia:

Sindrome da microdelezione 22q11

Project number:

GGP19103

64. BOOSTING MITOCHONDRIAL BIOGENESIS DURING POSTNATAL DEVELOPMENT TO PREVENT COGNITIVE DEFICITS IN 22Q11 DELETION SYNDROME.

Anthony L.^[1], Eva D.O.F.^[1], Federica C.^[2], Laura F.*^[2], Nicole D.^[1], Daniela R.^[3], Claudia B.^[1], Manuel M.^[1], Franck P.^[4], Paola B.^[1]

^[1]UNIL ~ Lausanne ~ Switzerland, ^[2]University Sapienza ~ Rome ~ Italy, ^[3]Maugeri Foundation, UNIPV ~ Pavia ~ Italy,

^[4]Dep. of Neuroscience, Mortimer B. Zuckerman ~ New York ~ United States of America

22q11 deletion syndrome (DS) is a neurodevelopmental disorder characterized by behavioral and cognitive deficits. The psychotic symptoms and related cognitive deficits emerge at the time of the transition from late childhood to adolescence, which has led to the hypotheses that 22q11DS should be studied in the context of developmental processes and that preadolescent interventions aimed at promoting normal brain development may prevent its occurrence. Among the genes deleted in the 22q11, six encode for mitochondrial proteins. Here, we examined mRNA levels of mitochondrial genes in brain tissues of schizophrenia-model mice (LgDel mice) and found that BCL-XL was significantly downregulated in the prefrontal cortex (PFC) during the 2nd-3rd weeks of postnatal development corresponding to the weaning-sensitive time window. We thus checked whether the decreased levels of BCL-XL could have a role in the neuroanatomical and cognitive deficits associated to 22q11DS and we chronically treated LgDel mice with a biologically active peptide consisting of an active domain of BCL-XL fused to the protein transduction domain of the HIV-TAT protein. We found that the TAT peptide increased mitochondrial biogenesis and led to a permanent rescue of synaptogenesis, PFC circuits functions and cognitive deficits in LgDel mice. Therefore the appearance of cognitive deficits can be prevented by treatments supporting the mitochondrial biogenesis during a sensitive time window in the schizophrenia-model mice, suggesting therapeutic strategies to prevent the onset of schizophrenia.

Il potenziamento della biogenesi mitocondriale durante lo sviluppo postnatale per prevenire i deficit cognitivi nella sindrome da delezione 22q11

La sindrome da delezione 22q11 è un disturbo dello sviluppo neurologico caratterizzato da deficit comportamentali e cognitivi. I sintomi psicotici e i relativi deficit cognitivi emergono al momento della transizione dalla tarda infanzia all'adolescenza, il che ha portato ad ipotizzare che la sindrome 22q11 debba essere studiata nel contesto dei processi di sviluppo e che gli interventi preadolescenziali volti a promuovere il normale sviluppo cerebrale possano impedirne l'occorrenza. Tra i geni eliminati nel 22q11, sei codificano per le proteine mitocondriali. Noi abbiamo esaminato i livelli di mRNA dei geni mitocondriali nei tessuti cerebrali di topi schizofrenici (topi LgDel) e abbiamo scoperto che BCL-XL era diminuito nella corteccia prefrontale (PFC) durante la 2a-3a settimana di sviluppo postnatale che nel topo corrisponde al periodo dello svezzamento. Abbiamo quindi verificato se i ridotti livelli di BCL-XL potessero avere un ruolo nei deficit neuroanatomici e cognitivi associati alla sindrome 22q11 e abbiamo trattato cronicamente topi LgDel con un peptide biologicamente attivo costituito da un dominio attivo di BCL-XL fuso al dominio di trasduzione della proteina della proteina HIV-TAT. Abbiamo scoperto che il peptide TAT ha aumentato la biogenesi mitocondriale e ha portato a un miglioramento permanente della sinaptogenesi, delle funzioni dei circuiti PFC e dei deficit cognitivi nei topi LgDel. Pertanto la comparsa di deficit cognitivi nel modello murino di schizofrenia può essere prevenuta mediante trattamenti che supportano la biogenesi mitocondriale durante il periodo critico per la plasticità e la

rapida crescita cerebrale che corrisponde alla fine dell'allattamento, suggerendo nuove strategie terapeutiche per prevenire l'insorgenza della schizofrenia nei pazienti con sindrome 22q11.

Disease Name:

22q11.2 deletion syndrome

Nome malattia:

Sindrome da microdelezione 22q11

Project number:

GGP20037

65. MECHANISMS OF SYNAPTIC DYSFUNCTION IN THE ANGELMAN SYNDROME

Baronchelli F.^[2], Biagioni M.^[1], Di Nunzio M.^[1], Erreni M.^[1], Folci A.^[3], Fossati M.^[3]

^[1]Humanitas Research Hospital ~ Rozzano (MI) ~ Italy, ^[2]CNR Neuroscience Institute; Humanitas University ~ Milan ~ Italy, ^[3]CNR Neuroscience Institute; Humanitas Research Hospital ~ Milan ~ Italy

The Angelman Syndrome (AS) is a neurodevelopmental disorder characterized by severe intellectual disability, motor delay, speech impairment, hyperactivity and seizures. This pathological condition is caused by the loss of maternally expressed (and paternally imprinted) UBE3A gene, which encodes an E3 ubiquitin ligase. Indeed, as the UBE3A dosage results critical in proper brain function, alterations in these levels lead to pathological phenotypes. Although considerable efforts have been put to dissect the molecular underpinnings of UBE3A function in neurons, the pathogenic mechanisms of these neurodevelopmental disorders are still poorly understood, and, for this reason effective treatments are not available yet.

Being an E3 ubiquitin ligase, defective ubiquitination is thought to be a primary mechanism underlying synaptic dysfunction in AS. Increasing evidence indicates that a tight functional interplay between ubiquitination and sumoylation, a ubiquitin-related PTM, consisting in the covalent conjugation of the 100aa-long Small Ubiquitin-like MODifier (SUMO) proteins to target proteins. In the brain, the SUMO machinery finely modulates synaptic and extrasynaptic pathways that are fundamental to neuronal circuit formation and function.

In this project, we evaluate the impact of UBE3A loss on synaptic development, and test the hypothesis that alterations of the functional cross-talk between ubiquitination and sumoylation might contribute to AS pathogenesis. Using different animal models of AS, we provide preliminary morphological and structural data suggesting that UBE3A controls distinct of the development of excitatory and inhibitory synapses. In particular, our data suggest a possible isoform-specific regulation of synaptic development by UBE3A. To explore the possibility that an unbalanced sumoylation is at the basis of AS we are currently evaluating sumoylation and sumoylomes of the nuclear and cytosolic fractions obtained from cortices of AS and wild type mice throughout neurodevelopment.

Together, our preliminary results suggest that the UBE3A gene is critical to synaptogenesis in cortical pyramidal neurons in vivo, ultimately regulating the ratio between excitation and inhibition through cell-autonomous and isoform-specific mechanisms.

Studio delle alterazioni della sumoilazione dipendenti da difetti genetici del gene UBE3A nella patogenesi della sindrome di Angelman e nell'autismo.

Le malattie psichiatriche e del neurosviluppo colpiscono milioni di persone nel mondo e hanno un drammatico impatto socio-economico sulla società. Nonostante grandi progressi siano stati recentemente compiuti nell'identificazione dei difetti genetici che contribuiscono all'eziologia di queste patologie, i relativi meccanismi patogenetici non sono ancora stati compresi. Di

conseguenza, non sono attualmente disponibili terapie farmacologiche efficaci. Nel presente programma di ricerca studieremo due disordini del neurosviluppo dovuti a difetti genetici del gene UBE3A. Delezioni di UBE3A causano la sindrome di Angelman (AS), caratterizzata da ritardo nello sviluppo, deficit motori, disabilità intellettuale, difficoltà nella comunicazione verbale ed iperattività, mentre duplicazioni o triplicazioni di UBE3A rappresentano il difetto citogenetico più comune associato all'autismo. Attraverso l'integrazione di sofisticati approcci sperimentali, che vanno dalla genetica molecolare alla proteomica e tecniche di microscopia ottica avanzata, ci proponiamo di studiare i meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza della sindrome di Angelman e dell'autismo. L'utilizzo di neuroni umani ottenuti da pazienti affetti da sindrome di Angelman attraverso la riprogrammazione ed il differenziamento di cellule staminali pluripotenti consentirà di validare ulteriormente le nostre osservazioni sperimentali in un contesto umano e clinico. Dai risultati ottenuti ci attendiamo che questo progetto possa contribuire a rivelare nuovi meccanismi patogenetici alla base della sindrome di Angelman e autismo e offrire nuove prospettive terapeutiche per queste terribili malattie.

Disease Name:

Angelman Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Angelman

Project number:

GGP20127

66. THE TETRASPANIN TSPAN5 REGULATES AMPARS EXOCYTOSIS BY INTERACTING WITH THE AP-4 COMPLEX

Moretto E., Passafaro M.*

CNR, Institute of Neuroscience, Milan 20129, Italy ~ CNR, Institute of Neuroscience, Milan 20129, Italy ~ Italy

Mutations in genes that encode subunits of the adaptor protein complex 4 (AP-4) cause a poorly understood syndrome characterized by spastic paraplegia and intellectual disability. Moreover, post-mortem analysis of the brain of AP-4-deficient patients has shown the presence of altered neuronal morphology and neurodegeneration. Given the severity of the neurological phenotype associated with the loss of AP-4, it is plausible that AP-4 plays an important role in brain development and neuronal function.

AP-4 belongs to a family of adaptor proteins (AP-1–AP-5) that are evolutionarily conserved protein complexes.

Interestingly, the AP-4 complex is known to associate with α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors (AMPA). We found that the deletion of AP-4 subunits compromises AMPAR trafficking in hippocampal neurons. Therefore, we hypothesize that AMPAR mis-sorting is involved in the neurological phenotypes associated with AP-4 deficiency.

Mutazioni nei geni che codificano per un complesso proteico denominato AP-4 causano una sindrome rara caratterizzata da grave disabilità intellettiva e paraplegia spastica progressiva, nota come sindrome da deficit di AP-4. L'analisi post-mortem del cervello di pazienti affetti della sindrome di deficit di AP4 ha mostrato la presenza di alterazioni neuronali. IL meccanismo con cui le mutazioni in questi geni causano un fenotipo neurologico così grave è sconosciuto. AP-4 appartiene alla famiglia di proteine adattatrici (AP1-5). Interessante, il complesso AP-4 è associato con i recettori per il glutammato di tipo AMPA . Inoltre noi abbiamo visto che la mancanza di AP-4

compromette il traffico dei recettori AMPA nei neuroni ippocampali in coltura. I recettori AMPA sono fondamentali per la comunicazione neuronale e il loro corretto funzionamento è richiesto per la plasticità sinaptica. Pertanto, ipotizziamo che una riduzione dei livelli di AMPAR nelle sinapsi dei pazienti con deficit di AP-4 possa indurre difetti nelle funzioni cognitive.

Disease Name:

AP4 deficiency Syndrome

Nome malattia:

Sindrome da deficit di AP5

Project number:

GJC21035

67. MECHANISMS AND DISEASE MODELS OF NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS INVOLVING CLC ANION TRANSPORTERS

Coppola M.A., Zuccoloni P., Zanardi I., Picco C., Barbieri R., Gavazzo P., Sbrana F., Pusch M.*

Istituto di Biofisica, CNR ~ Genova ~ Italy

Using deep sequencing strategies, rising numbers of patients with neurodegenerative and neurodevelopmental disorders are found carrying variants in genes encoding endo-lysosomal CLC chloride/proton transporters, CLCN3, CLCN4, CLCN6 and CLCN7. Phenotypes range from global developmental delay, intellectual disability, various psychiatric conditions, late or early onset neuronal ceroid lipofuscinosis, to neurodegeneration and myelination defects, to name a few. Currently, there is no cure for any of these diseases. While it is known that vesicular CLCs act as chloride/proton antiporters contributing to vesicular ion homeostasis, their precise roles in neurons are very little understood. Here, we build on our experience in investigation of vesicular CLCs in neurological/ neurodevelopmental disorders to push the frontier of research. Emerging CLC variants found in patients with neurological / neurodevelopmental disease will be deeply investigated, providing insight on causality and into molecular mechanisms of dysfunction. Recently discovered properties of vesicular CLC proteins will be investigated in the context of relevant disease pathological mechanisms. In addition to studying emerging variants, emphasis will be on the role of CLC-3 / CLC-4 heterodimers in the X-linked CLCN4 related condition, and on functional properties of CLC-6 and CLC-7 transporters. The project is of immediate benefit for patients regarding first-line information on emerging variants, but will also lay the foundation for immediate and intermediate-term follow up studies aimed at gene-therapy or pharmacological approaches targeting vesicular CLCs.

Meccanismi dei disturbi dello sviluppo neurologico che coinvolgono trasportatori di anioni della famiglia genica CLC

Varianti in più di 1000 geni diversi sono state implicate in varie forme di disabilità intellettive, ritardo dello sviluppo neurologico, neurodegenerazione e altre forme di malattie neurologiche che affliggono i pazienti pediatrici. Tra questi, i membri di una famiglia di geni che codificano per proteine di trasporto di anioni che sono importanti nelle strutture intracellulari dei neuroni (endosomi e lisosomi), risultano essere colpiti in un numero crescente di pazienti, la maggior parte dei quali mostra segni di malattia subito dopo la nascita. Questi geni sono chiamati CLCN3, CLCN4, CLCN6 e CLCN7. Il nostro gruppo ha esperienza a lungo termine nello studio delle proteine codificate da questi geni ed è stato recentemente coinvolto nello studio di un gran numero di varianti dei geni CLCN3, CLCN4 e CLCN6 trovate nei pazienti. I nostri studi hanno rivelato nuovi

meccanismi patologici correlati ai geni CLC. Nel presente progetto, intendiamo estendere questi studi a nuove varianti emergenti dei geni CLC e decifrare nuovi meccanismi molecolari di come le mutazioni genetiche nei geni CLC causino alterazioni specifiche nella funzione delle proteine. Queste informazioni sono prerequisiti per futuri interventi terapeutici o farmacologici.

Disease Name:

CLCN3-7 related neurodevelopmental disorders

Nome malattia:

Disturbi dello sviluppo neurologico correlati a CLCN3-7

Project number:

GMR22T1029

68. CREATINE DEFICIENCY SYNDROME: NOVEL INSIGHT INTO BRAIN FUNCTION AND THERAPEUTIC STRATEGIES

Montani C.^[3], Ghirardini E.^[1], Di Vetta F.^[2], Dadà L.^[2], Calugi F.^[2], Iovino L.^[1], Sagona G.^[2], Galbusera A.^[3], De Guzman E.^[3], Gozzi A.^[3], Baroncelli L.^{*(1)}

^[1]Department of Developmental Neuroscience, IRCCS Stella Maris Foundation ~ Pisa ~ Italy, ^[2]Institute of Neuroscience, National Research Council (CNR), ~ Pisa ~ Italy, ^[3]Functional Neuroimaging Laboratory, Istituto Italiano di Tecnologia, Center for Neuroscience and Cognitive Systems ~ Rovereto ~ Italy

Creatine Transporter Deficiency (CTD) is an X-linked metabolic disorder, caused by multiple mutations in the *Slc6a8* gene, and presenting with cerebral creatine (Cr) deficiency, early intellectual disability, epilepsy and autistic-like behavior. CTD is still incurable and the search for pathogenetic mechanisms is fundamental for the development of the therapeutic pipeline. This multisite project has two aims: i) to investigate how brain circuits are affected by Cr depletion at different stages of disorder progression; ii) to explore gene therapy as a possible therapeutic strategy. To this purpose, we longitudinally mapped brain-wide functional connectivity using resting state fMRI (rsfMRI) in mutants and control littermates of a murine model of CTD, and probed corresponding behavioural alterations using assays sensitive to cognitive abilities and motor stereotypies. Importantly, we also assessed the efficacy of a genetic rescue strategy based on perinatal ICV administration of an AAV vector expressing a functional form of the human *SLC6A8* gene. We found that CTD mutant mice showed extended fMRI hypo-connectivity at postnatal day 40 (PND40), and more focal hippocampal and motor cortical hypo-connectivity in the adult stage (PND140). Notably, fMRI connectivity disruption was completely rescued by gene therapy in juvenile animals, but only marginally improved in adulthood. At the behavioural level, we found that gene replacement did not improve cognitive deficits, but reduced body weight loss and significantly ameliorated autistic-like behaviour in CTD mutants. Overall, the rescue effect of the probed genetic therapy was partial and did not affect all the relevant phenotypes. We believe that the partial rescue of mutant phenotype might be attributable to the insufficient dosing of *SLC6A8*, but we have also evidence that the overexpression of the gene causes toxic effects due to the overload of protein synthesis in the endoplasmic reticulum and/or the osmotic action of Cr. To mitigate these issues, we are now testing an alternative viral cassette, based on the use of the endogenous human promoter of *Slc6a8*.

Il deficit del trasportatore di creatina (CTD) è un disordine metabolico legato all'X, causato da molteplici mutazioni nel gene *Slc6a8*, che si presenta con deficit di creatina cerebrale (Cr), disabilità intellettiva, epilessia e comportamento di tipo autistico. Il CTD è ancora incurabile e la ricerca dei meccanismi patogenetici è fondamentale per lo sviluppo di nuove terapie. Questo

progetto multisito ha due obiettivi: i) indagare come i circuiti cerebrali sono influenzati dalla deplezione di Cr nelle diverse fasi della progressione della patologia; ii) esplorare la terapia genica come possibile strategia di intervento. A tal fine, abbiamo mappato longitudinalmente la connettività funzionale dell'intero cervello utilizzando la fMRI in stato di riposo (rsfMRI) in topi mutanti e wild-type di un modello murino di CTD, ed abbiamo analizzato le corrispondenti alterazioni comportamentali utilizzando saggi sensibili alle capacità cognitive e alle stereotipie motorie. Abbiamo poi valutato nello stesso modello l'efficacia di una strategia di terapia genica basata sulla somministrazione perinatale intracerebrale di un vettore AAV che esprime una forma funzionale del gene umano SLC6A8. Abbiamo scoperto che i topi mutanti CTD mostrano una ipo-connettività estesa al giorno 40 postnatale (PND40) ed una ipo-connettività più focale, a livello ippocampale e della corteccia motoria, nella fase adulta (PND140). L'alterazione della connettività fMRI viene completamente recuperata dalla terapia genica negli animali giovani, mentre si osserva un miglioramento solo marginale nell'età adulta. A livello comportamentale, tuttavia, abbiamo scoperto che il nostro approccio di sostituzione genica non migliora i deficit cognitivi, ma riduce solo la perdita di peso corporeo ed il comportamento di tipo autistico nei mutanti CTD. Nel complesso, l'effetto benefico della terapia genetica è solo parziale e non si estende a tutti i fenotipi rilevanti. Riteniamo che il recupero parziale del fenotipo mutante possa essere attribuibile al dosaggio insufficiente di SLC6A8, ma abbiamo anche evidenza che la sovraespressione del gene provoca effetti tossici dovuti al sovraccarico della sintesi proteica nel reticolo endoplasmatico e/o all'azione osmotica di Cr. Per mitigare questi problemi, stiamo ora testando una cassetta virale alternativa, basata sull'uso del promotore umano endogeno di Slc6a8.

Disease Name:

Creatine Transporter Deficiency

Nome malattia:

Deficit del Trasportatore della Creatina

Project number:

GGP19177

69. MODELING FMR1 EXPRESSION DYNAMIC DURING FIRST PHASES OF NEURODEVELOPMENT USING FXS IPSC-DERIVED 3D CORTICAL BRAIN ORGANOID

D'Ercole M.*^[1], Laterza C.^[1], Cesare E.^[1], Stuart H.^[5], Gagliano O.^[1], Angiolillo S.^[1], Zorzan I.^[2], Polli R.^[3], Martello G.^[4], Murgia A.^[6], Elvassore N.^[1]

^[1]Venetian Institute of Molecular Medicine (VIMM) ~ Padova ~ Italy, ^[2]Epigenetics Programme, Babraham Institute ~ Cambridge ~ United Kingdom, ^[3]Department of Woman's and Child's Health, University Hospital of Padua ~ Padova ~ Italy, ^[4]Department of Molecular Medicine, Medical School, University of Padua ~ Padova ~ Italy, ^[5]The Francis Crick Institute ~ London ~ United Kingdom, ^[6]Department of Neurosciences, University Hospital of Padua ~ Padova ~ Italy

Fragile X Syndrome (FXS) is an X-linked neurodevelopmental disorder and the main form of inherited intellectual disability. It is caused by the expansion of a CGG sequence to more than 200 repeats in the promoter of the fragile X mental retardation 1 gene (FMR1) that determines its silencing through methylation during embryonic development. Evidence from chorionic villi analysis reports that the full mutated (FM) FMR1 gene is actively expressed during the first trimester of gestation, but the exact time and process of silencing are still unclear.

In this context, our work aims to develop a more accurate in vitro model of the developing FXS human brain in which to define the dynamics of FMR1 gene silencing by identifying the time and cell population in which its expression is switched off.

To follow our purpose, we developed an innovative in vitro model of human embryonic neurodevelopment generated from naïve induced pluripotent stem cells (iPSCs).

Naïve iPSCs are characterized by a broad hypomethylated genome, including in the FMR1 locus, and better resemble what happens in vivo compared to conventional primed hypermethylated iPSCs in which the FMR1 locus is not reactivated upon reprogramming.

Thus, we developed a highly efficient reprogramming method via microfluidics that allowed us to reprogram FXS fibroblasts into primed and isogenic naïve iPSCs. We confirmed the unique ability of naïve iPSCs to demethylate the FMR1 promoter, reactivating its transcription and translation.

Then, we set up a differentiation protocol for naïve iPSCs into 3D cortical brain organoids, which mimics the human cortical brain development. We applied it on FM demethylated naïve FXS iPSCs, to investigate FMR1 expression through differentiation and maturation.

We followed the neural differentiation of FXS cortical organoids for up to 4 months and we observed either that: i) hypermethylation of FMR1 locus occurred very rapidly during neural differentiation and both FMR1 mRNA and protein were downregulated; ii) FMR1 locus methylated only partially (in longer alleles) and the unmethylated alleles underwent shortening falling in the premutation category; iii) FMR1 locus did not methylate leading to an increased expression of FMR1 mRNA more than 5 folds compared to the healthy control associated to the presence of intranuclear inclusions, typical of permutations.

The results of our work show that we have a tractable model in which we can investigate key targetable mechanisms of FXS pathogenesis. In our 3D FXS cortical organoids we can identify which cell type is more sensitive to FMR1 silencing, helping the development of suitable treatments for FXS patients.

Organoidi corticali come modello per lo studio dell'espressione di FMR1 durante le prime fasi di neurosviluppo in pazienti della sindrome dell'X fragile

La sindrome dell'X fragile è la principale causa monogenica di autismo e la più frequente forma di disabilità mentale. È causata dall'espansione trinucleotidica di CGG nel promotore del gene FMR1 e dal successivo silenziamento dello stesso. Da analisi condotte su villi corionici, la proteina FMRP è presente durante il primo trimestre di gravidanza, dopodiché risulta assente.

L'obiettivo del nostro progetto è investigare le modifiche genetiche ed epigenetiche del gene FMR1 alla base della patologia durante lo sviluppo neuroembrionale. Per raggiungere il nostro obiettivo, abbiamo generato un modello in vitro paziente specifico dello sviluppo della corteccia partendo da cellule staminali. Tramite la riprogrammazione di cellule somatiche di paziente a cellule staminali indotte a uno stadio naïve, ovvero corrispondente a uno stadio pre-impianto dell'embrione, è possibile riattivare l'espressione di FMR1. In seguito, queste cellule staminali indotte sono state differenziate in organoidi corticali, che ricapitolano in vitro lo sviluppo neuroembrionale che avviene in vivo.

Lo studio delle primissime fasi embrionali di neurodifferenziamento tramite gli organoidi derivati da cellule di paziente può portare all'individuazione di meccanismi chiave per la patogenesi della sindrome dell'X Fragile e al conseguente sviluppo di strategie terapeutiche.

Disease Name:

Fragile X Syndrome

Nome malattia:

Sindrome dell'X Fragile

Project number:

GGP20105

70. NEW THERAPEUTIC STRATEGIES FOR THE FRAGILE X SYNDROME

Pedini G.*^[1], Cencelli G.^[1], Rosina E.^[1], Mercaldo V.^[2], Gentile A.^[1], Pacini L.^[3], Farace M.G.^[1], Achsel T.^[2], Bagni C.^[1]

^[1]Department of Biomedicine and Prevention, Faculty of Medicine, University of Rome Tor Vergata ~ Rome ~ Italy,

^[2]Department of Fundamental Neurosciences, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne ~ Lausanne ~ Switzerland, ^[3]Faculty of Medicine, UniCamillus, Saint Camillus International University of Health and Medical Sciences ~ Rome ~ Italy

The Fragile X Syndrome (FXS) is the most common form of inherited intellectual disability and autism, caused by the absence of the Fragile X Messenger Ribonucleoprotein (FMRP). Currently, no cure is available for FXS. Several clinical trials aiming at developing therapeutic strategies for FXS have failed to improve FXS defects.

FMRP is an RNA-binding protein regulating the metabolism of several messenger ribonucleic acids (mRNAs) encoding for synaptic proteins, including the beta-amyloid precursor protein (APP) and the alpha-secretase ADAM10, both dysregulated in FXS. Noteworthy, we have successfully restored some key FXS-like phenotypes in the Fmr1 KO mouse model targeting APP metabolism using a peptide-based approach, specifically a cell permeable TAT-Pro peptide that reduces ADAM10 activity. Notably, as next step we successfully used the TAT-Pro peptide on human induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-derived FXS neurons. The modulation of ADAM10 activity reestablishes molecular deficits observed in FXS, such as the excess of protein synthesis.

Finally, recently mRNA-based therapy arises as a potential therapeutic approach for the treatment of a broad range of diseases. mRNA play a crucial role in the cell, transferring the genetic information from the DNA into the protein, the functional product of a gene. mRNA therapy allows patients' cells to synthesize the protein lacking in the disease. Promising data obtained in our laboratory using FMR1 mRNA and human FXS cells support the peptide- and mRNA-based approaches as innovative therapeutic strategies for FXS. The results of the current project will lay the ground for new avenues with potential therapeutic value in FXS.

Nuovi approcci terapeutici per la Sindrome dell'X Fragile

La sindrome dell'X fragile (FXS) è la forma più comune di disabilità intellettiva di tipo ereditario e la principale causa monogenica di autismo, causata dall'assenza della proteina Fragile X Messenger Ribonucleoprotein (FMRP). FMRP è una proteina che lega e regola il metabolismo di molti RNA messaggeri (mRNA) che codificano per proteine sinaptiche, tra cui la proteina precursore della beta-amiloide (APP) e l'alfa-secretasi ADAM10, due proteine deregolate nella FXS. In un precedente lavoro del nostro laboratorio condotto sul modello murino Fmr1 KO abbiamo dimostrato che l'utilizzo di un peptide permeabile alle cellule TAT-Pro, specifico per la modulazione del metabolismo dell'APP riducendo l'attività di ADAM10, ripristina alcuni fenotipi chiave della FXS. Attualmente non è disponibile alcuna cura per la FXS. Diversi studi clinici volti a sviluppare strategie terapeutiche per la FXS non sono riusciti a migliorarne i fenotipi caratteristici della sindrome. Negli ultimi anni sta emergendo l'utilizzo di acidi nucleici come potenziale nuovo approccio terapeutico per il trattamento di una vasta gamma di malattie. L'mRNA svolge un ruolo fondamentale nella cellula, trasferendo l'informazione genetica dal DNA alla proteina, il prodotto funzionale di un gene. La terapia a base di mRNA consente alle cellule dei pazienti di sintetizzare la proteina mancante nella malattia, al fine di curare condizioni specifiche.

Con questo progetto ci proponiamo di studiare due nuove categorie di farmaci per la FXS. Utilizzando due approcci complementari, andremo ad esplorare il ripristino di alcuni fenotipi caratteristici della FXS, sia in cellule umane neuronali che non neuronali. Nello specifico, andremo ad usare 1) un approccio basato su un peptide che modula il metabolismo dell'APP; 2) una terapia basata sull'mRNA, andando a ripristinare i livelli della proteina FMRP.

Da un punto di vista traslazionale, abbiamo ottenuto ottimi risultati impiegando il peptide TAT-Pro

su neuroni umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). La modulazione dell'attività di ADAM10 ristabilisce le principali anomalie molecolari osservate nella FXS. Inoltre, i promettenti dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio attraverso l'uso dell'mRNA di FMR1 rafforzano la possibilità di realizzare il progetto descritto e sostengono la nostra ipotesi di esplorare nuovi approcci basati sull'impiego di peptidi e mRNA come strategie terapeutiche per la FXS.

I risultati del presente progetto apriranno possibili scenari per il disegno di nuove strategie terapeutiche per la FXS.

Disease Name:

Fragile X Syndrome

Nome malattia:

Sindrome dell'X Fragile

Project number:

GGP20137

71. RAC GTPASE IN INTELLECTUAL DISABILITY: PRECLINICAL OPPORTUNITIES FROM INTERFERING WITH A RAC1 SPECIFIC PROTEIN::PROTEIN INTERACTION

Liaci C.^[1], Prandi L.^[1], Rando S.^[1], Contini A.^[2], Coppa C.^[2], Conti L.^[3], Merlo G.*^[1]

^[1]Dept Molecular Biotechnology, University of TORINO ~ TORINO ~ Italy, ^[2]Dept. Pharmacological Science, University of Milano ~ MILANO ~ Italy, ^[3]Dept Cell, Computational and Integrated Biology - CIBIO - University of Trento ~ TRENTO ~ Italy

Neurodevelopmental disorders (NDD) affect more than 3% of the worldwide population and are characterized by the inability to reach cognitive, emotional, and motor developmental milestones. Intellectual Disability (ID) and Microcephaly (MC) are often concomitant phenotypes. A set of gene mutations causing ID and/or MC lead to altered cytoskeleton dynamics caused by altered signalling in the Rho GTPase RAC1 pathway. This is the case of TRIO and ARHGEF6/ α -PIX, two RAC1 activators.

The lack of reliable models to study human neuronal development, and thus stage- and region-specific protein functions, limits our knowledge of cellular mechanisms that finely control key developmental steps, especially in the context of the ID and MC. This in turn hampers the possibility to test rescuing strategies in a reliable way.

To address this, we are implementing two parallel strategies:

A. We have generated human iPSC - derived cell models (i.e., radial glial cells and dorsal-forebrain post-mitotic neurons) to recapitulate the neurodevelopmental process, by introducing TRIO and ARHGEF6 disrupting mutations. We are currently investigating mitotic parameters, cell organization and polarity, differentiation, and network formation in vitro.

B. We are attempting to achieve a GTPase-specific, modest and controlled positive re-modulation of RAC1 activity in the mutant context, by using a peptide sequence designed on the interaction pocket of RAC1 with its endogenous inhibitors (i.e., GAP proteins), and thus able to interfere. Such compounds will be tested in the aforementioned human cell models as well as in vivo in Arhgef6 Y/- mice, representing a valid model of X-linked ID.

Titolo: Il ruolo della GTPasi RAC1 nella disabilità intellettiva e nella microcefalia: una ricerca sul meccanismo patologico e sulla possibilità di correzione mediante interferenza peptidica.

I disturbi del neurosviluppo colpiscono oltre il 3% della popolazione causando ritardo o deficit della crescita motoria, cognitiva ed emotiva. Alcune mutazioni geniche causano Disabilità Intellettiva (DI) e Microcefalia (MC), spesso in concomitanza, alterando il delicato controllo della dinamica del citoscheletro di actina in seguito a una disregolazione di proteine appartenenti alla famiglia delle Rho GTPasi (ex. RAC1). Tra queste mutazioni si annoverano quelle a carico dei geni TRIO e ARHGEF6/ α -PIX, due noti attivatori di RAC1.

In assenza di modelli affidabili per lo studio dello sviluppo del cervello umano, ad oggi ci mancano le conoscenze sull'attività specifica di questi geni e sui meccanismi patofisiologici. Tale mancanza ha finora impedito di testare delle strategie di ripristino della funzione enzimatica.

Per ovviare a ciò stiamo attuando due strategie parallele:

A. Abbiamo ingegnerizzato cellule umane pluripotenti con le mutazione-malattia nei geni TRIO e ARHGEF6. Partendo da queste nuove linee cellulari, otteniamo progenitori neurali e neuroni maturi sui quali studiamo meccanismi di divisione cellulare, di organizzazione, e le proprietà di attività elettrica.

B. Testiamo nuove strategie di ri-attivazione della GTPasi RAC1 disegnando piccoli peptidi interferenti con gli inibitori endogeni della proteina. Specificatamente, questi peptidi verranno testati sui nostri modelli-malattia in vitro, come anche su animali Arhgef6Y/- , che presentano il difetto DI.

Disease Name:

Intellectual Disability, non-syndromic X-linked

Nome malattia:

Disabilità Intellettiva non sindromica, legata all'X

Project number:

GGP20039

72. DETAILING AND MODELING DENDRITIC SPINE PRUNING PATHWAYS AND COGNITION IN RAB39B XLID MOUSE MODEL

Francesca Z., Patrizia D.*

Molecular Genetics of Intellectual Disability, Division of Neuroscience, San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy

The most prominent neuronal phenotype in Intellectual Disability (ID), as in others neurodevelopmental disorders, is abnormalities in dendritic spines formation, pruning and maintenance suggesting that this is a common hallmark for disorders that include deficits in cognition and information processing (Bian, 2015). The molecular mechanism underlying spines development and maturation is poorly defined thus, the importance to fully dissect the molecular networks controlling these events. To dissect the molecular network involved in synaptic pruning, we propose to use Rab39b-null murine model to determine the specific RAB39B-driven mechanism responsible for synaptic pruning defects.

RAB39B is a neuronal RAB GTPase that controls intracellular trafficking and, in tandem with PICK1, drives the GluA2/GluA3 AMPAR trafficking throughout the secretory pathway to achieve AMPAR subunits insertion at the neuronal post-synaptic terminal (Mignogna, 2015).

The lack of RAB39B in Rab39b-null mouse, leads to an increased surface expression of GluA2-

lacking Ca²⁺-permeable AMPAR that results in immature spine asset caused by an unsuccessful neuronal dendritic spine refinement around 30 days of age. Mechanistically, the absence of subunit switching from GluA2-lacking Ca²⁺-permeable to GluA2-containing Ca²⁺-impermeable AMPAR that is absent during development, results in a permanent Ca²⁺-permeable AMPAR asset determining the failure of dendritic spine pruning (Mignogna, 2021). The consequent increase in intracellular Ca²⁺ influx results in a more excitable synaptic network, in immature spine asset with hyper-dynamic behavior and in cognitive alterations. Our main goal is to identify and modulate the specific protein cascade affected by the absence of GluA2-AMPA switching with the final aim to revert spine-pruning defect ameliorating cognitive performance of Rab39b-null pre-clinical model.

Definizione e modulazione dei meccanismi alla base dello sviluppo delle spine neuronali e del funzionamento cognitivo nel modello murino Rab39b per disabilità intellettiva

La disabilità intellettiva è una malattia pediatrica, con incidenza del 2-3% nella popolazione, ad alto impatto medico e sociale. I disturbi cognitivi da soli o associati ad altre malattie hanno forti ricadute sulla sfera personale, emozionale, sociale e lavorativa dei pazienti affetti. La disabilità intellettiva, come altre malattie del neurosviluppo, è principalmente caratterizzata da alterazioni nello sviluppo delle spine dendritiche dei neuroni cerebrali, unità di base della trasmissione sinaptica. Le anomalie delle spine dendritiche sono un segno distintivo per i disturbi che includono alterazioni nei processi di acquisizione e mantenimento delle informazioni. La ricerca condotta su queste patologie è fondamentale per comprendere le reti molecolari che controllano lo sviluppo, il rimodellamento e il mantenimento delle spine neuronali, per definirne l'eziologia e identificarne una possibile terapia. RAB39B è uno dei geni responsabili della disabilità intellettiva associata a disturbi dello spettro autistico. Codifica per una piccola GTPasi che, se assente, causa difetti nella corretta maturazione delle spine neuronali, ripercuotendosi sulle funzioni cognitive. L'obiettivo del progetto è di definire la cascata proteica interessata dalla mancanza di RAB39B, così da evidenziare il meccanismo molecolare responsabile della maturazione delle spine neuronali. In secondo luogo, il progetto mira a modulare con molecole specifiche la cascata proteica interessata. In questo modo, copriremo il grande divario sulla disabilità intellettiva, dove la complessità dei processi cellulari da trattare è la risposta all'assenza di terapie efficaci.

Disease Name:

Intellectual Disability, non-syndromic X-linked

Nome malattia:

Disabilità Intellettiva non sindromica, legata all'X

Project number:

GGP20065

73. EXPLORING THE EPIGENETIC REWIRING ASSOCIATED TO RLF MUTATIONS AS A DRIVER OF INTELLECTUAL DISABILITY

Banfi F.^[1], Luoni M.^[1], Belloni F.^[2], Bellini E.^[1], Jackson A.^[3], Banka S.^[3], Broccoli V.^[1], Sessa A.*^[2]

^[1]Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[2]Università Vita e Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[3]University of Manchester ~ Manchester ~ United Kingdom

Re-arranged L-Myc Fusion (RLF) is a zinc finger DNA binding protein originally found fused with L-MYC in some cancers. De novo heterozygous mutations in the RLF gene have been recently found in a cohort of patients with an array of symptoms including intellectual disability (ID), recognizable facial dysmorphism, motor delay, behavioral alterations, and occasional congenital

malformations. RLF protein has been involved with the regulation of critical elements of the epigenetic code which have been found altered in diseases phenotypically close to the condition of RLF patients. Details on RLF functions and its characterization in human settings are still missing. The aim of this project is the investigation of newly identified RLF mutations in patient deficits as leverage to find insights in pathophysiological mechanisms related to RLF.

We generated human isogenic iPSC lines carrying different RLF mutations including as controls RLF deletion in one or both alleles (RLF KO). We are exploiting our iPSC models to evaluate the effect of RLF truncated proteins as well as complete or partial LoF on neural derivatives, through the differentiation of cortical neural progenitors (NPCs), post-mitotic neurons and cerebral organoids. We started to phenotypically analyze RLF WT, Het and KO iPSC cells, testing them for karyotype, pluripotency, multi-germ layer differentiation, and proliferation showing results indistinguishable from the parental line. Mutant NPCs (RLF Het and KO) didn't display defects in both key markers and proliferative rate. On the other hand, the differentiation in cortical neuronal cells was affected for the yield and showed a defect in the shape of the neurons. We next aim to expand phenotypical analysis to cell lines carrying patient-specific mutations and to 3D cortical spheroids.

To better investigate the molecular role of RLF and its disease-inducing variants in neurological context, we performed preliminary genomic studies starting from RLF WT and KO iPSC lines, including transcriptomic analysis (RNA-seq), chromatin accessibility evaluation (ATAC-seq) and the profiling of DNA methylation (MeDIP-seq). We found a slightly higher prevalence for gene downregulation more than upregulation in RLF KO cells, that the mutant chromatin is less open than in control, and a highly methylated genome. Further analysis, including a proper integration between the datasets, and the expansion of genomic studies to the other cell lines and also to both 2D and 3D neural derivatives, will help to clarify the impact of the RLF absence and mutant forms on the chromatin at genome-wide level.

In conclusion, through our iPSC-based in vitro modelling, we foresee to identify those loci on the genome that are (i) sensitive to RFL LoF and/or mutations, (ii) important for transcription in neural cells, and (iii) at the basis of the related phenotypes. These data may provide hints on the role of RLF for the pathophysiology of the associated neurological diseases.

Studio delle alterazioni molecolari indotte da mutazioni nel gene RLF in casi di disabilità intellettiva.

Mutazioni in un gene chiamato RLF sono state individuate in pazienti con con disabilità intellettiva e alterazioni comportamentali. Le funzioni di gene e proteina associata sono poco note quindi le opzioni terapeutiche rimangono limitate. In questo progetto, abbiamo generato modelli sperimentali coerenti (di origine umana, con le mutazioni trovate nei pazienti, con cellule neurali) per lo studio del ruolo fisiologico di RLF e delle sue aberrazioni alla base della patologia umana. In questo momento stiamo ottenendo dati di sequenziamento del genoma e delle caratteristiche epigenetiche che ci stanno permettendo di indentificare meglio la funzione fisiologica di RLF e l'impatto delle sue mutazioni in particolare in modelli sperimentali che ricapitolano cellule neurali umane. A medio termine ci aspettiamo di generare quella conoscenza in grado poi di favorire lo sviluppo di terapie clinicamente rilevanti per i pazienti RLF.

Disease Name:

Intellectual disability-hypotonia-facial dysmorphism syndrome

Nome malattia:

Disabilità Intellettiva con dimorfismo facciale, simil-Kabuki

Project number:

GJC21090

74. DISSECTING THE PATHOMOLECULAR MECHANISMS OF PRR12 GENE INACTIVATION LEADING TO NEURODEVELOPMENTAL AND EYE ABNORMALITIES.

Alessia M.^[1], Mosca R.^[2], Martini D.^[1], Luoni M.^[2], Digregorio M.^[1], Andreazzoli M.^[1], Broccoli V.*^[2]

^[1]Dipartimento di Biologia, Università di Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[2]CNR, Istituto di Neuroscienze ~ Milano ~ Italy

PRR12 is a recently identified gene whose haploinsufficiency causes a syndrome associated with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorder (ASD) and eye abnormalities (Leduc et al., 2018; Reis et al., 2020, Chowdhury et al., 2021).

In this project, we plan to investigate the molecular mechanisms underlying the pathogenic effects of PRR12 haploinsufficiency. To this aim, we will analyze the molecular, cellular and behavioral phenotypes of mouse and zebrafish lines harboring heterozygous loss-of-function Prr12 mutations, also testing selected data obtained from human neural progenitor cells.

During the first months of this newly started project, we confirmed our preliminary results indicating a direct interaction between PRR12 and SOX2. As mutations in these two genes cause similar neurodevelopmental syndromes, and since PRR12 is a paralog of QSER1, a potent regulator of DNA demethylation, we will test if PRR12 might play a role in promoting DNA demethylation on Sox2 target genes. Furthermore, future experiments will assess genome-wide changes in gene expression, chromatin accessibility and DNA methylation in wild type versus PRR12-mutated human neural progenitor cells derived from iPS cells. In the same cells we will evaluate PRR12 and SOX2 chromatin occupancy and the ability of PRR12 to form condensates, as predicted by our protein structure analysis.

We cloned the PRR12 mouse ortholog tagged with GFP in a lentiviral vector and transduced Hek293 cells and mouse primary neuronal cultures. In both cell types, PRR12-GFP was found specifically localized in nuclei and virtually excluded by the cytoplasm. Analysis of single cell RNA-sequencing datasets of developing mouse and human brain at different stages inferred that PRR12 is widely expressed in multiple neuronal lineages with an enrichment in proliferative neuroprogenitor cells. We have also generated a targeting vector to produce a conditional Prr12 mutant mouse line and embryonic stem cells have been screening to select the desired homologous recombination event. At the same time, we cloned the zebrafish homologues of PRR12 and determined the spatio-temporal expression pattern of Prr12a. We found that this gene is expressed in the developing neural system since its initial specification and displays an antero-posterior expression gradient that becomes evident from 24 hours post fertilization. Prr12a expression persists in several areas of the zebrafish adult brain including areas corresponding to ASD-affected regions (Rea and Van Raay, 2021). Current experiments are aimed at characterizing zebrafish prr12 mutants. Overall, this work is expected to gain new molecular insights on the disease and to establish human iPSCs, mouse and zebrafish models of PRR12 haploinsufficiency that will provide complementary information in the proposed and in future experiments.

ANALISI DEI MECCANISMI PATOLOGICI DELL'INATTIVAZIONE DEL GENE PRR12 RESPONSABILE DELLE ALTERAZIONI DELLO SVILUPPO NEUROLOGICO E DELL'OCCHIO.

Le patologie del neurosviluppo sono una classe di patologie che colpiscono lo sviluppo e funzioni del cervello, e rappresentano un grave problema sociale in tutti i paesi. Queste patologie includono una grande varietà di malattie rare con eziologia eterogenea e condividono deficit che portano a disabilità cognitive, della comunicazione, comportamento adattivo ed abilità psicomotorie compromesse. Queste condizioni patologiche sono spesso associate a una varietà di problemi clinici tra cui ritardo dello sviluppo, difetti craniofacciali e disturbi oculari e la loro eterogeneità pone molte limitazioni a un approccio terapeutico efficace. Tuttavia, i recenti progressi biotecnologici nella capacità di scoprire nuovi geni e di associare il loro malfunzionamento a malattie specifiche hanno accelerato l'identificazione delle cause genetiche di diverse sindromi dello sviluppo neurologico. Una nuova causa scoperta recentemente dei disturbi dello sviluppo neurologico è

l'inattivazione parziale (aploinsufficienza) di PRR12, un gene la cui funzione non è stata ancora caratterizzata. L'obiettivo del nostro progetto è quello di comprendere il ruolo di PRR12 nelle cellule neuronali, permettendo così l'identificazione dei meccanismi molecolari coinvolti nella patologia. Nei primi mesi di questo progetto recentemente avviato, abbiamo confermato i nostri dati preliminari sull'interazione tra PRR12 e SOX2, un gene la cui aploinsufficienza causa un'altra sindrome dello sviluppo neurologico, e i nostri studi in corso permetteranno di capire le somiglianze e differenze nei loro meccanismi d'azione. Abbiamo inoltre iniziato a mettere a punto sistemi che riproducono l'aploinsufficienza di PRR12 in colture di cellule staminali, nel topo e nel pesce zebra, modelli animali ampiamente utilizzati nella ricerca biomedica. L'analisi integrata di questi complementari sistemi modello fornirà preziose informazioni per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'aploinsufficienza di PRR12 e per la progettazione di nuovi futuri interventi terapeutici.

Disease Name:

Neuroocular Syndrome

Nome malattia:

Sindrome neuro-oculare

Project number:

GJC21065

75. TARGETING OLIGODENDROGLIAL CELL DYSFUNCTIONS TO TREAT COGNITIVE DEFECTS AND EPILEPSY IN PRIMARY AUTOSOMAL RECESSIVE MICROCEPHALY-17 (MCPH17) MODELS

Khastkhodaei Ardakani M.^[1], Bonato M.^[1], Lorenzati M.^[1], Parolisi R.^[1], Vannini E.^[2], Pallavicini G.^[1], Di Cunto F.^[1], Buffo A.^[1], Boda E.*^[1]

^[1]Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, Department of Neuroscience, University of Turin ~ Orbassano (Turin) ~ Italy, ^[2]Institute of Neuroscience, CNR ~ Pisa ~ Italy

Primary autosomal recessive microcephaly-17 (MCPH17) is caused by truncating or kinase-dead mutations in CIT, which encodes for the Citron Kinase protein (CIT-K). Patients with truncating mutations show microcephaly, lissencephaly and neonatal mortality. Kinase-dead mutations are associated with a milder microcephaly, simplified gyrification, seizures and intellectual disability in long-term survivor patients (Li, Bielas et al., 2016; Harding, Moccia et al., 2016). Transgenic mouse lines modelling both MCPH17 types (i.e. Cit-k KO and kinase dead mice) recapitulate the main features of the pathology (Di Cunto et al., 2000).

Since CIT-K regulates cytoskeletal dynamics and DNA repair, Cit-K KO neural progenitors show abnormal cell division, DNA damage, early exit from cell cycle and apoptosis (Di Cunto et al., 2000; Bianchi et al., 2017). We also found severe hypomyelination in Cit-k KO mice and MCPH17 patients. Hypomyelination was not due to a defective oligodendrogenesis, but rather to oligodendrocyte progenitor cell (OPC) engagement in either cell death or cell senescence (Boda et al., 2022). Such OPC fates and hypomyelination were also present in conditional mouse mutants where Cit-k was deleted only in oligodendroglia, that also displayed spatial memory defects, indicating that oligodendroglia are affected independently of the neurogenesis/neuronal defects and suggesting that myelin/OPC defects may contribute per se to the cognitive impairment in MCPH17. Notably, despite not correcting microcephaly, a postnatal anti-oxidant treatment rescued OPC survival (but not myelination) and significantly reduced the epileptic and ataxic phenotypes of

Cit-k KO mice.

Based on this, here we propose a combination of functional, histological and transcriptomic analyses, genetic and pharmacological manipulations to target oligodendroglia dysfunctions, in order to sustain neuronal/circuitries maturation and function in MCPH17 models.

Correggere le disfunzioni delle cellule oligodendrogliali per il trattamento dei difetti cognitivi e dell'epilessia in modelli di microcefalia primaria autosomica recessiva 17 (MCPH17)

La microcefalia primaria autosomica recessiva 17 (MCPH17) è una microcefalia congenita causata da mutazioni nel gene CIT. A seconda della mutazione, i pazienti con MCPH17 mostrano un grado variabile di alterazioni neuroanatomiche e difetti funzionali. I pazienti che raggiungono le età più avanzate mostrano epilessia e disabilità intellettiva. Al momento sono disponibili modelli animali di MCPH17 che ricapitolano le caratteristiche principali della patologia.

Finora, la ricerca su MCPH17 si è concentrata esclusivamente sui difetti neuronali associati alle mutazioni CIT. Tuttavia, in studi recenti su modelli murini e pazienti MCPH17, abbiamo osservato anche alterazioni significative nelle cellule non neuronali, e in particolare negli oligodendrociti (OL), e dimostrato

che le disfunzioni degli OL sono indipendenti dai difetti neuronali e possono contribuire di per sé al difetto cognitivo in topi MCPH17. Abbiamo anche scoperto che, nonostante non corregga la microcefalia, un trattamento postnatale con un farmaco anti-ossidante è in grado di correggere almeno in parte le disfunzioni degli OL e riduce significativamente le manifestazioni epilettiche e i difetti motori nei modelli murini di MCPH17.

Sulla base di questi risultati, proponiamo una combinazione di approcci sperimentali e manipolazioni farmacologiche volte a correggere le disfunzioni degli OL, al fine di sostenere la maturazione e la funzione dei neuroni e dei circuiti nervosi nei modelli MCPH17, e possibilmente offrire una nuova opzione terapeutica che possa migliorare la qualità della vita dei pazienti con MCPH17.

Disease Name:

Primary microcephaly 18, autosomal recessive

Nome malattia:

Microcefalia primaria autosomica recessiva 17

Project number:

GMR22T1066

76. NEW VECTOR DESIGNING TO INCREASE EFFICACY AND SAFETY OF GENE-BASED THERAPIES FOR RETT SYNDROME

Luoni M., Giannelli S., Bellinazzi B., Rossi M., Broccoli V.*

Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy

Rett syndrome is an incurable neurodevelopmental 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. We exploited the AAV-PHP.eB to deliver an instability-prone Mecp2 (iMecp2) transgene cassette which, increasing RNA destabilization and inefficient protein

translation of the viral Mecp2 transgene, limits supraphysiological Mecp2 protein levels. Intravenous injections of the PHP.eB-iMecp2 virus in symptomatic Mecp2 mutant mice significantly improved locomotor activity, lifespan and gene expression normalization. Remarkably, PHP.eB-iMecp2 administration was well tolerated in female Mecp2 mutant or in wild-type animals. 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 iMecp2 provided widespread and efficient gene transfer maintaining physiological Mecp2 protein levels in the brain.

NUOVE STRATEGIE PER AUMENTARE L'EFFICACIA E LA SICUREZZA DELLA TERAPIA GENICA PER LA SINDROME DI RETT

La sindrome di Rett è una malattia incurabile dello sviluppo neurologico causata da mutazioni nel gene che codifica per la proteina 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. Abbiamo utilizzato il virus terapeutico AAV-PHP.eB insieme ad una nuova cassetta transgenica Mecp2 (iMecp2) che, aumentando la destabilizzazione dell'RNA e la ridotta traduzione proteica del transgene Mecp2, limita i livelli sopra-fisiologici della proteina MECP2. Le iniezioni endovenose del virus terapeutico PHP.eB-iMecp2 nei topi mutanti Mecp2 sintomatici hanno migliorato significativamente l'attività locomotoria, la durata della vita e la normalizzazione dell'espressione genica. Sorprendentemente, la somministrazione del PHP.eB-iMecp2 è stata ben tollerata negli animali di sesso femminile mutanti per Mecp2 o in quelli wild-type. Al contrario, abbiamo osservato una forte risposta immunitaria al transgene nei topi mutanti Mecp2 maschi trattati che è stata superata introducendo un'attiva e continua immunosoppressione. Nel complesso, l'utilizzo del vettore virale PHP.eB ha assicurato un trasferimento genico del gene terapeutico iMecp2 diffuso ed efficiente mantenendo i livelli fisiologici della proteina Mecp2 nel cervello.

Disease Name:

Rett Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Rett

Project number:

GGP19038

77. TARGETING RETT SYNDROME HYPEREXCITABILITY THROUGH ENHANCING GLUTAMATERGIC HOMEOSTASIS

Forastieri C.^[1], Romito E.^[1], Toffolo E.^[1], Papekaj A.^[1], Sala M.^[2], Rusconi F.^[1], Battaglioli E.^[1]

^[1]University of Milan, Dept. Medical Biotechnology and Translational Medicine ~ Milan ~ Italy, ^[2]CNR Istituto di Neuroscienze ~ Monza ~ Italy

Rett syndrome, a devastating dominant X-linked neurodevelopmental disorder largely caused by Mecp2 mutations, features peculiar pathological traits that can easily be assimilated to the autistic spectrum (1, 2). Young affected girls stereotypes, loss of behavioral milestones including language and movement, and severe epileptic crises, seem to be related to defective control of the glutamatergic compartment (3). At the circuitual level, indeed, decreased thresholds of excitatory neurons activation have been significantly associated to those behavioral traits that, mostly recapitulating human symptoms, characterize the murine models of the disease, among which the Bird's MeCP2Y⁻ mice (4). Within our research we described a physiological, cell autonomous epigenetic mechanism of glutamatergic homeostasis, potentially evolved to limit runaway excitation

in the mammalian brain (5). The system is based on dynamic alternative splicing regulation of a transcriptional corepressor, Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1). LSD1 restrains excitatory neuroplastic gene expression, negatively regulating both the Immediate Early Genes and relevant post-synaptic density effectors such as the SAP proteins, the AMPA receptors and PSD95 itself, limiting excitatory neurons excitability and protecting against seizures (6). The relative amount of LSD1 and its dominant negative splicing isoform neuroLSD1, including the microexon E8a –by definition, a facilitator of pro-excitatory neuroplastic programs–, contributes to the modulation of neuronal input/output ratios (5). Notably, neuroLSD1 isoform is overexpressed in MeCP2Y/- mice, potentially contributing to hyperexcitable profile (6). Within our project, we preliminarily demonstrated that genetically decreasing neuroLSD1 in the brain of MeCP2Y/- mice leads to a significant decrease of seizure susceptibility, with increased latency and reduced number of animals undergoing status epilepticus. Such a modification also impacts mortality, which is reduced by 2-fold.

We are currently implementing an exon E8a-skipping antisense oligonucleotide (AON-E8a)-based pharmacological approach to modify the relative ratio between LSD1 and neuroLSD1 in favor of LSD1. We consider this approach as potentially effective (also taking genetic data into account) in increasing the threshold of excitatory engagement thereby limiting brain excitability and targeting hyperexcitability of the Rett brain. Our first results, obtained by acute stereotaxic injection of AON-E8a in the central hippocampus of MeCP2Y/- mice uncovers a promising, preliminary amelioration of the locomotor activity, gait and general health of the model.

La sindrome di Rett rappresenta un devastante disordine del neurosviluppo ad ereditarietà X-linked. Largamente causata da mutazioni a livello del gene *Mecp2*, questa sindrome mostra tratti patologici peculiari, facilmente accomunabili allo spettro autistico. Le giovani pazienti mostrano stereotipie, perdita graduale del linguaggio e del movimento e severe crisi epilettiche, tutti sintomi ascrivibili ad un difettivo controllo del sistema neuronale eccitatorio. A livello dei circuiti cerebrali, una diminuita soglia di attivazione dei neuroni glutammatergici è stata convincentemente associata ai sintomi che, ricapitolando quelli delle pazienti, caratterizzano i modelli murini della malattia. Tra questi modelli vi sono i topi MeCP2Y/- generati nel laboratorio di Bird. Nel nostro Laboratorio abbiamo caratterizzato un sistema epigenetico fisiologico di omeostasi neuronale glutammatergica, evolutosi verosimilmente ai fini di proteggere i circuiti cerebrali da esagerata eccitabilità elettrica. Il sistema è basato sul complementare funzionamento delle due isoforme dell'enzima epigenetico Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) generate mediante un meccanismo di splicing alternativo. Rispettivamente le due isoforme LSD1 e neuroLSD1 (che include un tetrapeptide addizionale codificato dall'esone E8a, ed è ristretta ai neuroni) coregolano negativamente e positivamente un programma di espressione genica che modula l'eccitabilità neuronale. Tra i geni target figurano fattori importanti per il funzionamento della sinapsi eccitatoria come gli Immediate Early Genes, le proteine SAP, PSD95 e i recettori ionotropici AMPA. Nel reprimere la trascrizione di questi geni, LSD1 protegge dalle crisi epilettiche. E' interessante notare come il modello murino MeCP2Y/- sovraesprima neuroLSD1, suggerendo che sbilancio tra le due isoforme contribuisca al profilo di aumentata suscettibilità epilettica. Con il nostro progetto abbiamo preliminarmente dimostrato che la diminuzione genetica di neuroLSD1 nel cervello del modello MECP2Y/- porta ad un significativo decremento della suscettibilità convulsiva, con aumentate latenze e diminuito numero di animali che sviluppano uno stato epilettico. Tale approccio ha inoltre dimostrato di ridurre la mortalità epilettica di due volte. Stiamo ora implementando un approccio farmacologico basato su oligonucleotidi antisense (AON-E8a), mirato a contrastare l'inclusione dell'esone E8a, limitando l'espressione di neuroLSD1 rispetto ad LSD1. Consideriamo questo approccio potenzialmente efficace (anche tenendo conto dei dati genetici) nell'aumentare la soglia di attivazione dei circuiti eccitatori, limitando l'eccitabilità neuronale e trattando l'ipereccitabilità propria della sindrome di Rett. I nostri risultati, ottenuti mediante somministrazione stereotassica

acuta del farmaco nell'ippocampo centrale dei topi MeCP2Y^{-/-}, mostrano un promettente, preliminare miglioramento della attività motoria, della postura e della salute generale del modello.

Disease Name:

Rett Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Rett

Project number:

GGP20016

78. THE INTERPLAY BETWEEN HPCAL4 AND MECP2: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL PUTATIVE TARGET FOR RETT SYNDROME THERAPY

Pezzini S.^[1], Arcari A.^[1], Sandakly J.^[1], Scandella L.^[1], Francolini M.^[1], Fraviga E.^[2], Pozzi D.^[2], Landsberger N.*^[1]

^[1]University of Milan ~ Milan ~ Italy, ^[2]Humanitas University ~ Rozzano (Mi) ~ Italy

Rett Syndrome (RTT) is the leading cause of severe intellectual disability in female affecting 1:10000 females worldwide. Although its aetiology has been discovered almost twenty years ago with the identification of mutations in the X-linked gene MEPC2, the pathogenesis is still obscure. Cumulating evidence have highlighted main defects in neuronal cells, ranging from neuronal maturation to synaptic transmission, pinpointing the importance of neuronal signalling. A central determinant involved in neuronal signalling related to RTT defects is calcium, which regulates the activity of a plethora of calcium-dependent proteins involved in neuronal functions. The visin-like protein (VSNL) subfamily is a group of specific neuronal calcium sensors (NCSs) endowed with a calcium-myristoyl switch mechanism which allow to control different calcium-dependent process according to the subcellular localization of the proteins. Among these, VILIP-2 (visinin-like protein 2) also known as hippocalcin-like 4 (HPCAL4) is a Tdark gene whose function is unexplored. Evidence in literature together with our preliminary results supported a clear and robust downregulation of HPCAL4 mRNA in RTT indicating its possible involvement in the pathogenesis of this neurodevelopmental disorder.

With this project we aimed at investigating in depth the endogenous role of HPCAL4 in WT neurons and to clarify its link with neuronal dysfunctions associated to RTT.

We have initiated the project by defining HPCAI4 expression in WT developing and mature mouse brain and by comparing protein levels to those observed in RTT. Further, to identify HPCAL4 roles in WT neurons, we have analyzed its sub-cellular localization and regulation in primary hippocampal neurons in basal and activated conditions. Obtained results will be shown together with our preliminary studies aimed at identifying its role in WT neurons.

Studio di HPCAL4 e della sua interazione con MeCP2: identificazione e caratterizzazione di un nuovo possibile bersaglio terapeutico per il trattamento della sindrome di Rett

Il Calcio ha un ruolo fondamentale in tutte le cellule, in particolare nei neuroni dove la concentrazione di questo ione deve essere precisamente controllata per garantirne il corretto funzionamento. I difetti nella comunicazione fra neuroni, che si riscontrano spesso in diverse malattie neurologiche, possono derivare infatti dallo squilibrio della concentrazione del Calcio a causa di imperfetti meccanismi di controllo.

Nei neuroni c'è una proteina, chiamata HPCAL4, che sembra avere un ruolo importantissimo nella gestione del Calcio e che tuttavia, ad oggi, è ancora poco studiata e la cui funzione non è nota. La

domanda che ci poniamo è questa: cosa fa questo sensore del Calcio in un neurone sano, sia durante lo sviluppo che in età adulta? E la sua quantità o la sua funzione (o entrambe) sono alterate e contribuiscono all'insorgenza di disturbi neurologici come quelli che caratterizzano le bambine con la sindrome di Rett?

Perché pensiamo che questa proteina sia coinvolta nell'insorgenza della sindrome di Rett? Quello che sappiamo, dai nostri dati preliminari, avvalorati anche dai primi studi resi possibili da questo progetto, è che neuroni (e cervelli), in cui è presente la mutazione che nell'uomo causa la malattia, esprimono meno il gene che codifica per HPCAL4 rispetto a neuroni e cervelli sani. Questa associazione suggerisce una relazione causale fra le due condizioni. In questi due anni vogliamo indagare a fondo quale sia il ruolo di questo sensore del Calcio e quale il suo contributo alla comunicazione fra neuroni sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Se i nostri esperimenti dimostreranno che veramente questa molecola ha un ruolo importante nella comparsa di malattie del neurosviluppo, allora, studiandone i meccanismi d'azione nei neuroni sani e identificando quello che non funziona nei neuroni malati potremo cercare di sviluppare nuovi farmaci volti ad alleviare i sintomi delle bambine Rett e, potenzialmente anche di pazienti con altre malattie neurologiche.

Disease Name:

Rett Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Rett

Project number:

GJC21044

79. FUNCTIONAL STUDY ON A NEW PHARMACOLOGICAL APPROACH IN THE RETT SYNDROME

Cambria C.*, Antonucci F.

Dept. Biometra, University of Milan ~ Milan ~ Italy

Rett Syndrome (RTT) is a genetically defined neurodevelopmental disorder caused by mutations in the X-linked gene *Mecp2*, a transcriptional factor known to regulate gene expression. Up to now, treatments available are only partially effective and specific against some behavioural defects and thus, with this project we aim at unveiling novel pharmacological approaches in RTT children. In the *Mecp2*-null mice, a delayed GABA development due to a reduced expression of the chloride extruder *KCC2* has been described. Recently, we demonstrated that Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) modulates the excitatory/inhibitory ratio and controls *KCC2* levels, suggesting a possible role of ATM also in RTT. Indeed, ATM is found increased in the hippocampus of RTT pups and neurons and, coherently, its pharmacological inhibition is able to revert molecular and functional changes in *Mecp2y/-* neuronal cultures. In particular, it was demonstrated that administration of KU, the specific ATM kinase inhibitor, leads to proper GABAergic development and normalized *KCC2* levels. Also, in vivo in the mouse model for Dravet Syndrome (DS), i.e. mice expressing low *KCC2* levels and characterized by autistic-like behaviours, the long-lasting delivery of KU normalizes these defects. Since we already showed efficacy and safety of KU in *Mecp2y/-* neuron, in this project we will produce consistent results regarding KU action in RTT animals: we are going to evaluate cognitive and social performances as well as diseases-associated respiratory and motor phenotypes in *Mecp2y/-* mice after three weeks of KU administration. Also, in the attempt to unveil KU-mediated long lasting effects, we will analyze behaviours again after a period of drug

washout. The data here collected will allow to generate a complete panel of behavioural data useful for the identification of a novel and safe therapy aimed at restoring functional defects of RTT.

Studio funzionale di un nuovo approccio farmacologico per la sindrome di Rett

La sindrome di Rett (RTT) è un disordine del neurosviluppo causato da mutazioni al gene *Mecp2*, un fattore di trascrizione noto per regolare l'espressione genica. Ad oggi, sono disponibili trattamenti farmacologici solo parzialmente efficaci e specifici per alcuni dei difetti comportamentali; per questa ragione, lo scopo di questo progetto è studiare un nuovo approccio farmacologico per bambini RTT. In topi *Mecp2*-nulli è stato riscontrato un ritardato sviluppo del sistema GABAergico, a causa di una ridotta espressione del trasportatore del cloro KCC2. Inoltre, recentemente abbiamo dimostrato che la proteina Atassia Telangiectasia Mutata (ATM) controlla l'equilibrio eccitazione/inibizione presente nel sistema nervoso centrale e i livelli del trasportatore KCC2, suggerendo così un potenziale ruolo di ATM anche in RTT. Infatti, ATM è stata vista aumentata nell'ippocampo di cuccioli di topo e neuroni RTT e, coerentemente, la sua inibizione farmacologica è responsabile del recupero dei difetti molecolari e funzionali osservati nelle colture neuronali *Mecp2y/-*. In particolare, la somministrazione dell'agente KU, inibitore specifico della proteina ATM, promuove il corretto sviluppo del sistema GABAergico e normalizza l'espressione di KCC2. Inoltre, nel modello di topo della sindrome di Dravet, caratterizzato da ridotti livelli di KCC2 e fenotipo simil-autistico, la somministrazione prolungata di KU corregge i difetti appena menzionati. Di conseguenza, in questo progetto valuteremo l'effetto di KU in animali RTT: in seguito a tre settimane di somministrazione di KU saranno studiate le performance cognitive e sociali di topi *Mecp2y/-*; inoltre, il comportamento di questi animali sarà valutato anche in seguito ad un periodo di washout del farmaco, così da studiarne gli effetti della somministrazione a lungo termine. I risultati qui raccolti produrranno un pannello di dati comportamentali utili per l'identificazione di una terapia nuova e sicura per correggere i difetti funzionali caratteristici della sindrome di Rett.

Disease Name:

Rett Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Rett

Project number:

GSA22F003

80. BASE AND PRIME EDITING OF DNA AS NEW PERSONALIZED TREATMENT FOR RETT DISEASE

Tonetto E.^[1], Landsberger N.^[2], Liu D.^[3], Pinotti M.^[1], **Balestra D.*^[1]**

^[1]University of Ferrara ~ Ferrara ~ Italy, ^[2]University of Milan ~ Milan ~ Italy, ^[3]Harvard University ~ Cambridge ~ United States of America

Rett syndrome (RTT)(OMIM #312750) is a severe neuro-developmental disorder commonly caused by heterozygous loss-of-function mutations in the X-linked gene *MECP2*, encoding the epigenetic reader, methyl-CpG-binding protein 2 (1). Among all pathogenic variants, eight single nucleotide changes account for ~70% of all identified variations(2). Importantly, while loss of *MeCP2* function causes RTT, locus duplication also causes a severe neuro-developmental disorder, *MECP2* duplication syndrome (MDS)(3), suggesting that *MECP2* is a dosage-sensitive gene, with both loss and gain of function causing disease(4).

Despite early clinical trials have shown some therapeutic promise, no disease-modifying drugs are currently available(5). On the other hand, innovative approaches based on gene therapy, genome or RNA editing have been developed and provided promising results(6, 7). However, several issues which still need to be addressed prevented their further therapeutic development.

In this pioneer project, we propose the recently developed base (BE) and prime editing (PE) (8, 9) as tailored tools to correct the most common RTT-causing mutations. These approaches can ensure higher efficacy with a single intervention than standard Cas9 nuclease approaches, with negligible indel generation and off-target effects(10). These editors can be delivered by viral (11) or, preferably, non-viral gene delivery systems (12, 13). Their therapeutic potential has been demonstrated in many cell types and organisms(14, 15). In mice, these strategies also provided their efficiency in the installation of desired editing in the central nervous systems(16, 17), the primary site of MECP2 expression and manifestation of RTT disease.

We aim at providing evidence that the BE and PE can revert 4 out the 8 most frequent MECP2 pathogenic variants (p.R168*, p.R255*, p.R270*, p.R294*). To this purpose, we have created expression plasmids for MECP2-GFP fusion variants, editors (both BE and PE), and developed engineered MECP2 cellular models (stable and knock-in cell lines). We are currently in the screening phase aimed at identifying the best combination (editor with peg/gRNAs) able to target and correct the selected MECP2 variants. The evaluation of correction efficiency as well as specificity in ex-vivo cellular models, represented by patients' fibroblast cell lines available at the Telethon Network of Genetic Biobanks, will represent the next step in this one-year project.

If successful, the results will help attracting national and international funds and industrial partners to develop and optimize these new therapeutic options for RTT and pave the way for translations to other inherited human diseases, also of neurological onset. Overall, this project will provide the proof-of-concept that BE and PE can ensure effective and stable rescue of the natural MECP2 expression with a single intervention and may result in a life-long cure for people with RTT.

Base e Prime editing del DNA come nuovo trattamento personalizzato per la sindrome di Rett

La sindrome di Rett (RTT) (OMIM #312750) è un grave disturbo dello sviluppo neurologico comunemente causato da mutazioni localizzate nel gene MECP2, che codifica per la proteina analoga MECP2 (1). Tra tutte le mutazioni, 8 cambiamenti a singolo nucleotide rappresentano circa il 70% di tutte le variazioni identificate (2). È importante notare che, mentre la perdita della funzione di MeCP2 causa la RTT, la duplicazione del locus causa anche un grave disturbo dello sviluppo neurologico, la sindrome da duplicazione di MECP2 (MDS)(3), suggerendo che MECP2 è un gene sensibile al dosaggio, in cui sia la perdita che l'aumento di funzione causano la malattia(4).

Nonostante i primi studi clinici abbiano mostrato risultati promettenti, attualmente non sono disponibili farmaci per la malattia (5). D'altro canto, sono stati sviluppati approcci innovativi basati sulla terapia genica e sull'editing del genoma o dell'RNA, che hanno fornito risultati promettenti(6, 7). Tuttavia, diversi problemi ne hanno impedito l'ulteriore sviluppo terapeutico.

In questo progetto proponiamo i metodi di base (BE) e prime (PE) editing, recentemente sviluppati (8, 9), come strumenti su misura per correggere le mutazioni più comuni che causano RTT. Questi approcci, rispetto agli approcci standard basati sulla nucleasi Cas9, possono garantire un'efficacia maggiore con un singolo intervento, e sono associati ad effetti indesiderati trascurabili (10). Questi editor possono essere veicolati da sistemi virali (11) o, preferibilmente, non virali (12, 13). Il loro potenziale terapeutico è stato dimostrato in molti tipi di cellule e organismi (14, 15). Nei topi, queste strategie hanno dimostrato la loro efficacia anche nel sistema nervoso centrale (16, 17), il sito primario di espressione di MECP2 e di manifestazione della malattia RTT.

Il nostro obiettivo è fornire la prova che BE e la PE possono correggere 4 delle 8 varianti patogene più frequenti di MECP2 (p.R168*, p.R255*, p.R270*, p.R294*). A questo scopo, abbiamo creato plasmidi di espressione per le varianti di fusione MECP2-GFP, per gli editors (sia BE che PE) e sviluppato modelli cellulari MECP2 ingegnerizzati (linee cellulari stabili e knock-in). Attualmente

siamo in fase di screening per identificare la migliore combinazione (editor con suo RNA) in grado di colpire e correggere le varianti MECP2 selezionate. Il passo successivo sarà quello di valutare l'efficacia e la specificità in linee cellulari derivanti dai pazienti stessi disponibili presso le Biobanche Genetiche di Telethon.

In caso di successo, i risultati contribuiranno ad attrarre fondi nazionali e internazionali e partner industriali per sviluppare e ottimizzare queste nuove opzioni terapeutiche per la RTT.

Disease Name:

Rett Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Rett

Project number:

GSA22F015

81. IDENTIFICATION OF POSSIBLE THERAPEUTIC TARGETS TO RESCUE NEURONAL AND SYNAPTIC DYSFUNCTIONS CAUSED BY DELETIONS AND MUTATIONS OF THE TCF20 INTELLECTUAL DISABILITY GENE

Vinci E.^[1], Beretta S.^[1], Catanese A.^[2], Zippo A.^[1], Boeckers T.^[2], Verpelli C.^[1], Sala C.*^[1]

^[1]CNR Neuroscience Institute, Milano ~ Vedano al Lambro ~ Italy, ^[2]Institute of Anatomy and Cell Biology, Ulm University ~ Ulm ~ Germany

Mutations of the Transcription Factor 20 (TCF20) gene were found in patients presenting autism spectrum disorders (ASDs), intellectual disabilities (IDs), and other neurological problems and a new syndrome, named TAND syndrome (TCF20-associated neurodevelopmental disorders) were described with specific clinical features. Recently it has been reported that TCF20 has a role in the neurogenesis of mouse embryos but little is known about its molecular function in neurons. Here we present evidence that TCF20 is expressed in all mouse brain areas analyzed, and its expression raises during brain development. Moreover, we demonstrate that TCF20 has a central role in dendritic arborization and dendritic spine formation processes. Our RNAsequencing (RNA-seq) analysis revealed a downregulation of pre- and post-synaptic components in TCF20 knockdown neurons. We found decreased levels of GABRA1, BDNF, PSD-95, and c-Fos in total homogenates and in synaptosomal preparations of knockdown TCF20 rat cortical cultures. Additionally, GluN2B and GABRA5 were significantly downregulated while GluA2 was significantly upregulated in synaptosomal preparations of knockdown TCF20 rat cortical cultures.

Taken together, our preliminary data suggest that TCF20 is an essential player in neuronal development and function by modulating the expression of proteins involved in dendrite and synapse formation and function. Using in vivo and in vitro models, including iPSCs-derived neurons deleted of TCF20 gene, we will better define the function of TCF20 in neuronal development in order to identify therapeutical targets for rescuing the neuronal defects associated with TCF20 gene deletion and mutations.

Identificazione di possibili bersagli terapeutici per revertire le disfunzioni neuronali e sinaptiche causate da delezioni e mutazioni del gene della disabilità intellettiva TCF20

Mutazioni del gene del fattore di trascrizione 20 (TCF20) sono state trovate in pazienti che presentavano disturbi dello spettro autistico (ASD), disabilità intellettive (ID) e altri problemi neurologici e una nuova sindrome, chiamata sindrome TAND (disturbi dello sviluppo neurologico associato a TCF20) è stata descritta con caratteristiche cliniche specifiche. Recentemente è stato

riportato che il TCF20 ha un ruolo nella neurogenesi degli embrioni di topo, ma si sa poco della sua funzione molecolare nei neuroni. Abbiamo dimostrato che TCF20 è espresso in tutte le aree del cervello del topo analizzate e la sua espressione aumenta durante lo sviluppo del cervello. Inoltre, dimostriamo che TCF20 ha un ruolo centrale nell'arborizzazione dendritica e nei processi di formazione delle spine dendritiche. La nostra analisi di RNAsequencing (RNA-seq) ha rivelato una ridotta espressione dei componenti pre e post-sinaptici nei neuroni deleti del gene TCF20. Quindi i nostri dati preliminari suggeriscono che TCF20 è un attore essenziale nello sviluppo e nella funzione neuronale modulando l'espressione delle proteine coinvolte nella formazione e funzione dei dendriti e delle sinapsi. Utilizzando modelli in vivo e in vitro, inclusi i neuroni derivati da iPSCs deleti del gene TCF20, definiremo meglio la funzione del TCF20 nello sviluppo neuronale al fine di identificare bersagli terapeutici per il recupero dei difetti neuronali associati alla delezione e alle mutazioni del gene TCF20.

Disease Name:

TCF20-associated neurodevelopmental disorders

Nome malattia:

Disturbi dello sviluppo neurologico associati a mutazioni del gene TCF21

Project number:

GMR22T1061

82. FUNCTIONAL DISSECTION OF PRC2-DEPENDENT DYSREGULATION IN WEAVER SYNDROME THROUGH CORTICAL BRAIN ORGANOID AND CRISPR/CAS9 GENOME EDITING SYSTEM

Pezzali M.*^[1], Trattaro S.^[1], Vitriolo A.^[1], Sebastiani S.^[1], Cheroni C.^[1], Lo Riso P.^[1], Choufani S.^[2], Gabriele M.^[1], Pozzu D.^[3], Hughes J.^[4], Gibson W.^[5], Weksberg R.^[2], Testa G.^[1], Lopez Tobon A.^[1]

^[1]High Definition Disease Modelling Lab: Stem Cell and Organoid Epigenetics, IEO, European Institute of Oncology, IRCCS ~ Milan ~ Italy, ^[2]The Hospital for Sick Children ("HSC") ~ Toronto ~ Canada, ^[3]Humanitas research hospital ~ Milan ~ Italy, ^[4]Candiolo Cancer Institute ~ Turin ~ Italy, ^[5]BC Children's Hospital ~ Vancouver ~ Canada

Weaver syndrome (WS) is a rare, multisystem disorder. WS is characterized by pre- and post-natal overgrowth, macrocephaly and a variable degree of intellectual disability.

WS genetic cause was identified in heterozygous mutations in polycomb repressive complex 2 (PRC2) which catalyzes the methylation of lysine 27 on histone 3 (H3K27), promoting transcriptional repression during corticogenesis.

However, our knowledge on the impact of the heterozygous mutations causing WS on the landscape of H3K27 tri-methylation and on the transcriptome is still incomplete and several questions remain unsolved. To gain insight in molecular circuits underpinning the WS phenotype, we profiled at the transcriptomic and epigenomic level our cohort of patient-derived cortical brain organoids (CBOs) that comprises more than fifty organoid samples cultivated up to 100 days.

The intersection of differentially expressed genes (DEGs) between WS-CBOs and control CBOs, H3K27me3 ChIP-seq peaks, and DNA methylation profiles, revealed a dysregulation in cortical neuronal maturation and neuronal migration processes at day 25 and day 50 of differentiation.

This finding is consistent with clinical data from WS patients, whose MRI profiles show pachygyria due to an alteration of the cortical development in late stages of neuronal migration.

Therefore, to validate the transcriptional endophenotype of altered migration, we set up a 24-hour time-lapse experiment to analyze the migration of differentiating neural progenitors and neurons.

Among DEGs, AJAP1 is one of the most significantly and strongly upregulated in WS-CBOs. AJAP1 is an adherens junction associated protein that interacts with β -catenin in the E-cadherin-

catenin complex and is involved in cell migration and differentiation. Therefore, to elucidate the role of AJAP1 in WS, we established a CRISPRa/CRISPRi experiment: by upregulating the expression of AJAP1 in CTL-CBOs and by downregulating it in WS-CBOs, we aim to revert the phenotype in patients and recapitulate it in controls.

In conclusion, our findings support a dysregulation of migration throughout corticogenesis due to PRC2 heterozygous mutations in CBOs and we show that CBOs allow a fine characterization of the molecular features of neurodevelopmental disorders, providing the framework for therapeutic targeting.

Studio dei meccanismi biologici alla base della Sindrome di Weaver tramite l'uso di tipi cellulari neurali derivati da paziente

La sindrome di Weaver è una malattia genetica rara. I pazienti affetti dalla sindrome di Weaver sono caratterizzati da un'eccessiva crescita associata ad un iper-sviluppo del cranio. Inoltre, i pazienti presentano livelli variabili di disabilità intellettiva.

La sindrome di Weaver è una malattia genetica autosomica dominante, a insorgenza per lo più sporadica. Questo significa che una mutazione, che si manifesta in modo casuale, in una sola copia del gene del paziente, può essere sufficiente per causare la malattia.

Per studiare a fondo le cause della disabilità intellettiva tipica di questa malattia, abbiamo utilizzato cellule staminali derivate da pazienti per ottenere organoidi cerebrali, ovvero strutture tridimensionali che ricapitolano i vari stadi di sviluppo del cervello embrionale. Gli organoidi cerebrali derivati da cellule di paziente permettono di studiare le caratteristiche specifiche del paziente senza ricorrere all'utilizzo di modelli animali.

Da questi organoidi cerebrali è stato possibile ottenere l'insieme degli RNA messaggeri (mRNA) che vengono espressi nella corteccia durante le prime fasi dello sviluppo cerebrale. Analizzare l'espressione degli mRNA risulta particolarmente importante per questo progetto, poiché le mutazioni che causano la sindrome di Weaver portano al malfunzionamento della proteina Ezh2 che a sua volta porta alla scorretta regolazione di geni importanti per lo sviluppo e la crescita.

Grazie a questi dati abbiamo scoperto difetti nella maturazione dei neuroni e nei processi di migrazione neuronale negli organoidi cerebrali derivati da paziente. Questi dati sono in linea con dati clinici di pazienti, le cui risonanze magnetiche mostrano difetti di migrazione neuronale nelle fasi finali dello sviluppo corticale.

In conclusione, i nostri dati mostrano difetti nella migrazione neuronale durante lo sviluppo della corteccia cerebrale in organoidi cerebrali derivati da cellule di paziente e dimostrano come gli organoidi cerebrali possano permettere un'analisi fine dei meccanismi biologici alla base dei disturbi del neuro-sviluppo.

Disease Name:

Weaver Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Weaver

Project number:

GGP19295

83. SINGLE-CELL MULTIOMIC DISSECTION OF ELECTROPHYSIOLOGICAL CORRELATES OF WILLIAMS-BEUREN- AND 7Q11.23 MICRODUPLICATION-SYNDROMES

Vitriolo A.*^[1], Pezzali M.^[1], Trattaro S.^[1], Finazzi V.^[1], Capocéfalo D.^[1], Shyti R.^[1], Germain P.^[3], Testa G.^[2]

^[1]Human Technopole ~ Milano ~ Italy, ^[2]Università degli Studi di Milano La Statale ~ Milano ~ Italy, ^[3]ETH Zurich ~ Zurich ~ Switzerland

The Williams Beuren Critical Region comprises several chromatin and transcription regulators. Copy number variations (CNV) of this region cause a paradigmatic pair of neurodevelopmental disorders. Deletions of 7q11.23 cause Williams-Beuren Syndrome (WBS), which features hypersociability, high language skills with respect to individuals with analogous cognitive abilities, and reduced craniofacial development; 7q11.23 duplication syndrome is instead characterized by language deficits, social withdrawal and autism spectrum disorder (7DupASD), and rather opposite craniofacial structures when compared to individuals with WBS.

We performed a thorough disease modeling of 7q11.23 CNV on patient-specific induce-pluripotent stem cells (iPSC) and derivative neuronal models, and extensively profiled them by imaging and electrophysiology. Thus, we were able to pinpoint molecular and cellular endophenotypes related to opposite patterns, such as increased and decreased intrinsic synaptic excitability in WBS and 7DupASD respectively. Then, we profiled the same tissues via omics approaches to reconstruct the regulatory processes underlying such endophenotypes, from the chromatin regulation layer to the transcriptional and translational ones. Finally, we developed an in silico reverse-engineering approach to dissect core transcriptional and proteomic pathogenic signals.

To prove the translational impact of our discovery, we reproduced key traits of sociability impairments of the two conditions in mice, and rescued the 7Dup social withdrawal phenotype, by repurposing a small molecule designed to cure specific types of cancer.

To corroborate our results and dissect the molecular basis of the two disorders in a human context, we devised a CRISPR-based perturbation experiment, in cortical brain organoids, to reconstruct - in an isogenic background- genetic interactions between disease genes and their effectors. To characterize the impact of these perturbations, we generated multi-layer networks composed of all the information generated by all our experiments and previous analyses. Multilayer interrogation allows us to prioritize drugs with a higher specificity, that enrich specific gene-regulatory paths linked both to transcriptional dysregulations and electrophysiological signatures, and to HPO phenotypes related to WBS and 7DupASD. The final aim of our project is to test such molecules on WBS and 7DupASD cortical brain organoids and to validate their effective ability to revert patient-specific WBS and 7DupASD endophenotypes.

Identificazione di meccanismi molecolari capaci di spiegare gli sbilanciamenti dell'attività elettrofisiologica dei neuroni derivati da pazienti con sindrome di Williams.

Il nostro laboratorio si occupa di studiare i meccanismi molecolari delle malattie del neurosviluppo. Questo progetto si concentra sulla sindrome Williams e sulla opposta sindrome duplicativa della regione Williams (anche detta sindrome 7Dup). La nostra attività è basata sull'utilizzo della riprogrammazione cellulare, che permette di prelevare con tecniche potenzialmente non invasive tessuti di pazienti, per generare cellule staminali paziente-specifiche in laboratorio. Queste cellule possono quindi essere utilizzate per generare neuroni e altri tessuti rilevanti per mimare e studiare in laboratorio le malattie genetiche del neurosviluppo e il comportamento dei tipi cellulari affetti nella malattia, senza agire direttamente su individui umani, e limitando la necessità della sperimentazione animale. Attraverso tecniche avanzate di sequenziamento del DNA e del RNA, combinati con avanzate tecniche di microscopia e test sull'attività elettrica dei neuroni generati in laboratorio, abbiamo potuto identificare i meccanismi di regolazione genica che sottendono gli

sbilanciamenti elettrofisiologici identificati nei neuroni dei pazienti. In questo progetto, dopo aver identificato i meccanismi di regolazione genica compromessi nelle due malattie, abbiamo generato neuroni e organoidi di cervello - complessi tessuti che riproducono in vitro la struttura della corteccia cerebrale - per studiare il collegamento tra la compromissione della regolazione genica e una delle principali funzioni neuronali : la loro attività elettrica. Identificati questi meccanismi, abbiamo utilizzato tecnologie CRISPR per modificare individualmente l'attività regolativa di singoli geni direttamente responsabili delle funzioni neuronali compromesse nelle cellule derivate dai pazienti. I dati prodotti dal sequenziamento delle cellule generate in questi esperimenti sono stati trasformati in modo da poter essere messi in relazioni con banche dati rilevanti, che raccolgono informazioni sulla associazione di geni con tratti fisici e caratteriali tipici delle malattie studiate. Questo lavoro informatico ha permesso di comprendere molto più nel dettaglio le conseguenze dirette delle mutazioni che causano queste malattie. Essendo queste malattie causate dalla perdita o accumulazione di copie sovranumeriche dei geni della regione Williams, questo lavoro ha permesso di ricostruire la responsabilità e la funzione di ciascun gene della regione Williams nel generare i caratteristici tratti della malattia. Insieme a questo lungo lavoro di caratterizzazione funzionale, abbiamo potuto testare dei farmaci capaci di ristabilire il corretto funzionamento dei neuroni in vitro, e abbiamo anche potuto verificarne la capacità di migliorare il comportamento sociale di topi recanti la mutazione di GTF2I, un gene cruciale in queste malattie.

Disease Name:

Williams Beuren Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Williams

Project number:

GGP19226

Genetic neurological disorder\Neurodegenerative diseases

84. ROLE OF MYELOPEROXIDASE-MEDIATED NEUROINFLAMMATION IN ACERULOPLASMINEMIA

Ferrini B.^[1], Zanardi A.^[1], Conti A.^[1], Belloli S.^[1], Rainone P.^[1], Valtorta S.^[1], Moresco R.M.^[2], Gilberti E.^[3], De Palma G.^[3], Lana D.^[4], Giovannini M.G.^[4], Nardini I.^[5], Mori F.^[5], Zurlo G.^[5], Scali C.^[5], Caricasole A.^[5], **Alessio M.**^{*[6]}

^[1]IRCCS-San Raffaele Hospital ~ Milano ~ Italy, ^[2]University of Milano-Bicocca ~ Monza ~ Italy, ^[3]University of Brescia ~ Brescia ~ Italy, ^[4]University of Firenze ~ Firenze ~ Italy, ^[5]Kedrion SpA ~ Galliciano (LU) ~ Italy, ^[6]IRCCS-San Raffaele Hospital; University Vita Salute San Raffaele ~ Milano ~ Italy

Background:

Aceruloplasminemia is characterized by lack/inactivation of the ferroxidase ceruloplasmin (Cp), resulting in brain iron accumulation and neurodegeneration, whose mechanisms are poorly understood. In addition to enzymatic activity, Cp has another non-enzymatic function, namely inhibition of myeloperoxidase (MPO) a neuroinflammation mediator expressed by microglia. In the CpKO mouse model of aceruloplasminemia, we demonstrated the efficacy of Cp-replacement therapy in ameliorating neurological symptoms. Now, our preliminary results show astrocyte dysfunction and microglial activation in CpKO mice and Cp-treatment reverts the neuroinflammatory phenotype. Thus, we hypothesized that in aceruloplasminemia increased MPO-activity and microglia-mediated neuroinflammation may be responsible for early neuronal damage.

Objectives:

To define neuroinflammation's timing and the role of myeloperoxidase-mediated neuroinflammation in aceruloplasminemia, distinguishing Cp-ferroxidase activity from its MPO-inhibition role in exerting therapeutic effect.

Research design:

In CpKO mice we will assess neuroinflammation's occurrence along disease progression from early stages to overt neurodegeneration. In the same mice we will investigate brain MPO expression/activity and correlate them with neuroinflammation/neurodegeneration. Recombinant Cp and Cp-mutants in which the interaction with MPO is abolished without altering ferroxidase activity, or vice-versa, will be produced and employed for protein-replacement therapy in CpKO mice, examining the efficacy in mitigating neuroinflammation and/or neurodegeneration. To confirm MPO-mediated neuroinflammation, a group of animals will be treated with brain-penetrant MPO-inhibitor small-molecule.

Output:

Define the role of myeloperoxidase -mediated neuroinflammation as early pathological mechanism in aceruloplasminemia, disclosing novel therapeutic strategies. Determine the relative importance of Cp's ferroxidase activity and its MPO-inhibition function for the established Cp's neuroprotective activity in protein replacement therapy.

RUOLO DELLA NEUROINFIAMMAZIONE MEDIATA DA MIELOPEROSSIDASI NELL'ACERULOPLASMINEMIA

L'aceruloplasminemia è una malattia genetica ultrarara caratterizzata dalla mancanza dell'enzima ferrossidasi ceruloplasmina. Il disturbo è caratterizzato da accumulo di ferro nel cervello e neurodegenerazione, ma i meccanismi alla base della morte neuronale sono poco conosciuti. Attualmente nessuna terapia è disponibile. Oltre all'attività enzimatica, la ceruloplasmina ha

un'altra funzione non-enzimatica, ovvero l'inibizione della mieloperossidasi, una proteina che media la neuroinfiammazione. Nel modello murino della malattia abbiamo dimostrato che la somministrazione di ceruloplasmina è efficace nel migliorare i sintomi neurologici. Ora, i nostri studi preliminari mostrano che il modello murino presenta neuroinfiammazione e che il trattamento con ceruloplasmina la riduce. Pertanto, abbiamo ipotizzato che, in assenza di ceruloplasmina, l'aumento dell'attività della mieloperossidasi e la neuroinfiammazione possano essere responsabili di un danno neuronale precoce.

In questo progetto studieremo nel modello murino l'insorgenza di neuroinfiammazione nella malattia dalle fasi iniziali alla neurodegenerazione conclamata. Nel cervello di questi topi indagheremo il livello di espressione e l'attività della mieloperossidasi e li metteremo in correlazione con neuroinfiammazione e/o neurodegenerazione. L'obiettivo è definire il ruolo della neuroinfiammazione mediata dalla mieloperossidasi come meccanismo patologico precoce nell'aceruloplasminemia, che può indicare nuove strategie terapeutiche. Inoltre, per determinare l'importanza relativa dell'attività ferrossidasica della ceruloplasmina e della sua funzione inibitoria della mieloperossidasi nell'esercizio dell'effetto terapeutico, la ceruloplasmina ricombinante e i mutanti della ceruloplasmina ricombinante in cui la funzione inibitoria della mieloperossidasi è abolita senza alterare l'attività enzimatica della ferrossidasasi, o viceversa, saranno prodotti e impiegati per la somministrazione terapeutica nel modello murino della malattia, esaminandone l'efficacia nel mitigare la neuroinfiammazione e/o la neurodegenerazione.

Disease Name:

Aceruloplasminemia

Nome malattia:

Aceruloplasminemia

Project number:

GMR22T1053

85. TARGETING MITOCHONDRIAL METABOLISM TO PROMOTE NEURONAL MATURATION IN AHDS: DEVELOPING NEW THERAPEUTIC APPROACHES IN 3D MOUSE BRAIN MODELS

Ciarpella F.*, Pedrotti G., Santanatoglia C., Lucidi B., Rossi E., Zamfir R.G., De Tomi E., Malerba G., Malpeli G., Bottani E., Decimo I.

University of Verona ~ Verona ~ Italy

Allan Herndon Dudley Syndrome (AHDS) is a rare X-linked syndrome caused by mutations in the SLC16A2 gene encoding for monocarboxylate transporter 8 (MCT8), a specific transporter for thyroid hormone T3, preventing its entrance the central nervous system (CNS) and severely affecting brain development. Beside the critical role in the development of the nervous system, T3 is a major regulator of CNS metabolism and mitochondrial activity. This Telethon project aims to i) study the cellular and molecular consequences of hypothyroidism on neuronal differentiation; ii) target mitochondrial metabolism by pharmacological approaches to restore neuronal maturation in AHDS. We established a murine cerebral organoid model of AHDS (AHDS-like organoids) by removing T3 from the culture media. T3 deprivation resulted in a sustained proliferative and stemness profile of AHDS-like organoids over time, along with a delayed maturation of the neuronal population and a different composition of the overall cellular population. Indeed, astrocytes emerged as the most representative population in AHDS-like organoids, also influencing their functionality – evaluated by spontaneous calcium activity imaging. AHDS-like organoids strongly upregulated the expression of genes involved in DNA replication, cell cycle and G2/M

transition while downregulated genes involved in ions homeostasis and neuronal action potential activities. Albeit we did not unravel differences in the cellular metabolism of AHDS models compared to controls, they downregulated the processes of mtDNA replication, mitochondrial fission and fusion, decreased the expression of OXPHOS complexes and impaired the fatty acid metabolism. We selected Nicotinamide Riboside (NR), a NAD⁺ precursor activating the Sirtuin1/PGC-1 α pathway of mitochondrial biogenesis, as therapeutic strategy. NR treatment increased the AHDS-like organoids mtDNA content, reduced their stemness and content of glial cells. This data indicated that the lack of T3 significantly halted the neuronal commitment of brain organoids and that the neuronal differentiation could be favoured by enhancing mitochondrial metabolism.

Il metabolismo mitocondriale come target per promuovere il completo sviluppo neuronale in AHDS: sviluppo di nuovi approcci terapeutici in modelli cerebrali murini tridimensionali

La sindrome di Allan-Herndon-Dudley (AHDS) è un raro disturbo dello sviluppo del cervello che causa gravi disabilità intellettive e problemi di movimento. L'AHDS è causata da mutazioni del gene SLC16A2, necessario per la produzione di una proteina, detta MCT8, che ha un ruolo chiave nello sviluppo del sistema nervoso. MCT8 trasporta un ormone, chiamato triiodotironina o T3, all'interno dei neuroni. Il T3 serve per il normale sviluppo del cervello e, agendo sui mitocondri, le centrali elettriche delle cellule, regola le reazioni chimiche che producono energia (metabolismo). Questo progetto ha lo scopo di i) studiare le conseguenze cellulari e molecolari dell'assenza di T3 sul differenziamento neuronale; ii) agire sul metabolismo mitocondriale mediante approcci farmacologici per ripristinare la maturazione neuronale nell'AHDS. Abbiamo creato in laboratorio un mini-cervello (chiamato organoide) come modello per l'AHDS, cresciuto in assenza di T3. In mancanza di T3, l'organoide mostra un ritardo nella maturazione neuronale e nel suo sviluppo, caratterizzato dalla presenza di un elevato numero di cellule proliferanti ed immature e, complessivamente, una diversa composizione cellulare rispetto ad organoidi cresciuti in presenza di T3. Infatti, gli organoidi AHDS mostrano pochi neuroni, con un basso grado di maturazione e funzionalità, e molti astrociti, l'altra componente cellulare caratteristica del sistema nervoso. Gli organoidi AHDS presentano una maggiore espressione dei geni coinvolti nella replicazione del DNA e nel ciclo cellulare, mentre i geni coinvolti nello sviluppo neuronale sono poco espressi. Inoltre, abbiamo notato una diminuzione nei livelli di espressione di geni coinvolti nei processi metabolici. Abbiamo così selezionato una molecola, Nicotinamide Riboside (NR), che ha un ruolo nel sostenere il metabolismo mitocondriale. Il trattamento con NR ha aumentato il contenuto di DNA mitocondriale degli organoidi, ha ridotto la loro immaturità ed il contenuto di astrociti. Questi dati indicano che la mancanza di T3 determina un difetto dello sviluppo neuronale, il quale potrebbe essere favorito agendo sul metabolismo mitocondriale.

Disease Name:

Allan-Herndon-Dudley Syndrome (MCT8 deficiency)

Nome malattia:

Sindrome di Allan-Herndon-Dudley (Deficit di MCT8)

Project number:

GSA22H001

86. REPURPOSING CFTR CORRECTORS IN ALLAN HERNDON DUDLEY SYNDROME

Scano M.*^[1], Carotti M.^[1], Caccin P.^[1], Benetollo A.^[1], Dalla Barba F.^[1], Carelli S.^[4], Schweizer U.^[2], Cereda C.^[3], Tonduti D.^[5], Sandonà D.^[1]

^[1]University of Padova, Department of Biomedical Sciences ~ Padova ~ Italy, ^[2]University of Bonn, Institut für Biochemie und Molekularbiologie ~ Bonn ~ Germany, ^[3]Center of Functional Genomics and Rare Diseases, V. Buzzi Children's Hospital, Milan, Italy ~ Milan ~ Italy, ^[4]Romeo ed Enrica Invernizzi pediatric Research Center, Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, Italy ~ Milano ~ Italy, ^[5]Child Neurology Unit - COALA (Center for Diagnosis and Treatment of Leukodystrophies and Genetic Leukoencephalopathies), V. Buzzi Children's Hospital - University of Milan, Italy ~ Milano ~ Italy

Allan Herndon Dudley syndrome (AHDS) is a rare and severe X-linked genetic disease caused by defects in SLC16A2, the gene encoding the monocarboxylate transporter 8 (MCT-8). Affected males present with early onset severe encephalopathy combined with abnormal thyroid hormone (TH) levels in the blood. The first symptoms appear during the first year of life and the disease evolution is highly disabling [1, 2]. In the brain, hypothyroidism is responsible for the defective neuronal development and the progressive functional impairments, and it is mainly due to the impaired transport of T3 through the blood brain barrier (BBB). Conversely, the elevated blood level of T3 results in peripheral tissue thyrotoxicity, where transporters other than MCT8 are expressed [2, 3]. Presently, no cure is available, and the sole pharmacological approach, which progressed toward clinical trials is the use of an analog of the THs, the Triac compound [4].

Mutations in the SLC16A2 gene can impair either the synthesis or the activity of the transporter, while many others affect its folding, stability and/or localization. Thus, in the effort of searching for a therapeutic solution, we propose the use of compounds known as CFTR correctors to rescue the expression and localization of those MCT8 mutants characterized by problems of folding/trafficking. The idea arose from the evidence that correctors are effective not only on CFTR type II mutants, but on mutated proteins as different as sarcoglycans or sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase, responsible for sarcoglycanopathy or Brody myopathy respectively [5-8]. On these premises, we decided to test a small panel of CFTR correctors in AHDS. Particularly, we focused on MCT8 mutants characterized by residual functionality but low expression/low plasma membrane localization or defective translocation to the cell surface. Different CFTR correctors, both in single and combined administration were tested in a heterologous cell system, with the idea that the combination may result in similar efficacy with reduced side effects because of the reduced doses.

To assess the functionality of the MCT8, the conventional method is based on the uptake of radioactive T3 by the cells [9]. Besides the application of this method, to minimize the need of using radioactive compounds, we are generating a biosensor in which the TH transporter functionality is indirectly measured through a system composed by the TH receptor and the TH response elements (TRE) controlling the transcription of the reporter gene luciferase.

Lastly, we have started the generation of iPSCs from primary fibroblast from AHDS subjects. They will be useful for the final validation of the therapeutic approach using human pathological samples. Altogether, our data highlight the potential of CFTR correctors in the treatment of AHDS when the MCT8 mutants maintain some functionality. Several other mutations and additional CFTR correctors are presently under investigation.

RIUTILIZZO DEI CORRETTORI CFTR NELLA SINDROME DI ALLAN HERNDON DUDLEY

La sindrome di Allan Herndon Dudley (AHDS) è una malattia genetica rara legata al cromosoma X, causata da difetti nel gene SLC16A2 che codifica il trasportatore degli acidi monocarbossilici 8

(MCT-8). I maschi ammalati presentano una precoce e grave encefalite accompagnata da livelli anormali di ormone tiroidei (TH) nel sangue. L'evoluzione della malattia è fortemente invalidante [1, 2]. Nel cervello, l'ipotiroidismo è responsabile dello sviluppo neuronale difettoso e delle progressive riduzioni funzionali, ed è primariamente causato dal trasporto alterato dell'ormone T3 attraverso la barriera ematoencefalica. Al contrario, l'elevato livello ematico di T3 provoca tireotossicità nei tessuti periferici, dove sono espressi trasportatori diversi da MCT8 [2, 3]. Non è ancora disponibile una cura e l'unico approccio farmacologico, attualmente in fase clinica, è l'uso di un analogo degli ormoni tiroidei: il composto Triac [4].

Mutazioni di SLC16A2 possono compromettere la sintesi o l'attività del trasportatore, mentre molte altre ne influenzano il ripiegamento, la stabilità e la localizzazione. Pertanto, nella ricerca di una soluzione terapeutica, proponiamo l'uso di composti noti come correttori CFTR per recuperare l'espressione e la localizzazione dei mutanti di MCT8 con problemi di folding/trafficking. L'idea è nata dall'evidenza che i correttori sono efficaci non solo sui mutanti CFTR di tipo II, ma anche su quelli di proteine diverse come i sarcoglicani o la calcio-ATPasi del reticolo sarco/endoplasmatico, responsabili rispettivamente delle sarcoglicanopatie e della miopatia di Brody [5-8]. Abbiamo così deciso di testare un piccolo numero di correttori CFTR in AHDS. Ci siamo concentrati su mutanti MCT8 caratterizzati da ridotta funzionalità, espressione e localizzazione in membrana plasmatica, somministrando diversi correttori CFTR singolarmente o in combinazione, in un sistema cellulare eterologo, con l'idea che la combinazione possa avere efficacia simile con effetti collaterali ridotti.

Per valutare la funzionalità dell'MCT8 utilizzeremo il metodo convenzionale che si basa sull'assorbimento di T3 radioattivo da parte delle cellule [9]. Inoltre, per ridurre al minimo la necessità di utilizzare composti radioattivi, stiamo generando un biosensore che permette di misurare la funzionalità del trasportatore TH indirettamente attraverso un sistema composto dal recettore TH e dal TH response elements (TRE) che controllano la trascrizione del gene reporter luciferasi.

Infine, grazie alla generazione iniziata recentemente, di iPSC da fibroblasti primari di soggetti AHDS, potremo validare l'approccio terapeutico utilizzando campioni patologici umani.

Nel complesso, i nostri dati evidenziano il potenziale dei correttori CFTR nel trattamento dell'AHDS quando i mutanti MCT8 sono parzialmente funzionali. Diverse altre mutazioni e ulteriori correttori CFTR sono attualmente in studio.

Disease Name:

Allan-Herndon-Dudley Syndrome (MCT8 deficiency)

Nome malattia:

Sindrome di Allan-Herndon-Dudley (Deficit di MCT8)

Project number:

GSA22H002

87. MENINGES AS AN OVERLOOKED PHARMACOLOGICAL TARGET FOR GLOBOID CELL LEUKODYSTROPHY

Amenta A.^[1], Zulkifal M.^[1], Ricca A.^[2], Cascino F.^[2], Dolci S.^[3], Ciarpella F.^[3], Riva M.^[4], Decimo I.^[3], Gritti A.^[2], Bifari F.^[1]

^[1]Laboratory of Cell Metabolism and Regenerative Medicine, Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy ~ Milano ~ Italy, ^[2]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy ~ Milano ~ Italy, ^[3]Department of Diagnostic and Public Health, University of Verona, Italy ~ Verona ~ Italy, ^[4]Neurosurgery Unit, Humantias Research Hospital, Rozzano, Italy ~ Rozzano ~ Italy

Globoid cell Leukodystrophy Disease (GLD) is a neurodegenerative life-threatening disease caused by genetic defects in the lysosomal enzyme galactosylceramidase (GALC). It involves dysfunctional metabolism of sphingolipids and is inherited in an autosomal recessive pattern. GLD manifests early in life (3 months to 6 years) with rapid progression (within 2 years) (Wenger DA et al. Hum Mutat 1997). There is no cure for GLD. Treatment options are still very poor (Kohlschütter A. Handb Clin Neurol 2013). Here, we consider GLD pathogenesis and therapy from an entirely new angle, evaluating GLD neurodegeneration and therapy by changing the focus from the neurons and oligodendrocytes to the non-parenchymal brain cells. Specifically, we studied the involvement of meninges in GLD pathogenesis and progression. Meninges are highly heterogeneous tissue with trophic, immune and neurogenic properties (Bifari et al Cell Stem Cell 2017). In this Telethon project, we assessed GLD-induced activation of meningeal immune cell and neural precursors in a mouse model of GLD at pre-onset, onset and late stage of the disease. We found at very early disease stage (pre-onset) a GLD-induced activation in meninges consisting of several immune cell types increased, including monocytes and neutrophils. Moreover, GLD-induced increase and modification of the distribution and phenotype of NPCs present in meninges. These data demonstrate, for the first time, that GLD-induced alterations are present in brain meninges before the clinical onset and the neural parenchyma involvement.

Furthermore, we performed proof of concept of the efficacy and safety of supra-physiological GALC expression in human neurons derived from somatic adult human meningeal NPCs. LV-GALC transduced human meningeal NPCs, human meningeal derived-neurons, -oligodendrocytes and -brain organoids, which expressed supra-physiological level of GALC showed the maintenance of stem cell and multipotent neural differentiation potential. GALC-overexpressing brain organoids demonstrate self-assembly properties and differentiatonal potential in neurons, oligodendrocytes and astrocytes. Therefore LV-GALC transduction can be considered a potential therapeutic target for meningeal-directed in vivo gene therapy.

Meningi: target farmacologico sottovalutato per la leucodistrofia a cellule globoidi

La leucodistrofia a cellule globoidi (GLD) è una grave malattia neurodegenerativa causata dalla mancanza del gene che codifica per l'enzima lisosomiale galattocerebrosidasi (GALC). Si tratta di una malattia ereditaria autosomica recessiva in cui l'assenza dell'enzima altera il metabolismo degli sfingolipidi. La GLD colpisce i bambini di età compresa tra i 3 mesi e i 6 anni e progredisce molto rapidamente (entro i 2 anni). Ad oggi non ci sono cure per la GLD e le terapie disponibili non sono sufficienti. In questo lavoro, studiamo da una prospettiva diversa la patogenesi ed eventuale terapia per la GLD, spostando la nostra attenzione dai neuroni e oligodendrociti, presenti nel cervello, alla componente stromale del cervello: le meningi. Il nostro obiettivo è quello di studiare il coinvolgimento delle meningi nei processi di patogenesi e progressione della malattia. Le meningi sono un tessuto eterogeneo, dotato di funzioni trofiche, immunitarie e neurogeniche. In questo progetto Telethon abbiamo valutato se la GLD può indurre l'attivazione di cellule immunitarie e precursori neurali della meninge, in un modello murino di malattia, prima della manifestazione clinica della malattia, all'insorgenza e in fase avanzata di malattia. Dalle analisi effettuate, abbiamo scoperto un aumento di cellule immunitarie, inclusi monociti e neutrofilii, nelle meningi prima dell'insorgenza della malattia. Inoltre, la GLD induce alterazioni del numero, distribuzione e fenotipo di precursori neurali in meninge. Questi dati dimostrano per la prima volta che nelle meningi che rivestono il cervello avvengono alterazioni indotte dalla malattia che si verificano prima dell'insorgenza clinica e del coinvolgimento del parenchima cerebrale stesso.

Successivamente, abbiamo testato la sicurezza e l'efficacia della sovraespressione dell'enzima GALC in neuroni umani, derivati da precursori neurali della meninge umana adulta, trasdotti con un vettore lentivirale contenete GALC (LV-GALC). I precursori neurali, neuroni, oligodendrociti ed organoidi cerebrali derivati dalla meninge umana ed overesprimenti GALC mantengono le proprietà staminali e il potenziale differenziativo multipotente. Inoltre, gli organoidi cerebrali overesprimenti GALC sono in grado di auto-organizzarsi e differenziare in neuroni, oligodendrociti

ed astrociti. Per cui la trasduzione con LV-GALC può essere considerato un potenziale approccio terapeutico per la terapia genica in vivo sulle meningi.

Disease Name:

Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe disease)

Nome malattia:

Leucodistrofia a cellule globoidi (Malattia di Krabbe)

Project number:

GGP19250

88. IN VITRO VALIDATION OF LENTIVIRAL VECTORS ENCODING FOR CHIMERIC MURINE AND HUMAN GALC ENZYMES TO IMPROVE THE EFFICACY OF GENE THERAPY APPROACHES FOR GLOBOID CELL LEUKODYSTROPHY

Ricca A.^[1], Cascino F.^[1], Freschi M.^[1], Picciotti I.^[2], Valeri E.^[1], Unali G.^[1], Morena F.^[3], Martino S.^[3], Kajaste-Rudnitski A.^[1], Gritti A.^[1]

^[1]San Raffaele Istituto Telethon per la Terapia Genica, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[2]Vita-Salute San Raffaele University ~ Milan ~ Italy, ^[3]University of Perugia ~ Perugia ~ Italy

Globoid cell leukodystrophy (GLD) is a lysosomal storage disorder (LSD) caused by the deficiency of the β -galactosylceramidase (GALC) enzyme, which leads to the accumulation of toxic substrates in myelinating cells and consequent severe dysfunction of the central and peripheral nervous system. Experimental and clinical evidence suggests that the therapeutic benefit of ex vivo lentiviral vector (LV) hematopoietic stem cell (HSC) gene therapy (GT) in neurodegenerative LSDs relies on supraphysiological enzyme production by transduced cells and widespread enzyme distribution in affected tissues. In GLD, the limited GALC overexpression achieved in HSCs ultimately results in insufficient enzyme production and secretion by transplanted cells, overall diminishing enzyme bioavailability. Chimeric lysosomal enzymes with increased bioavailability may benefit GLD, reducing the requirement for a high level of GALC overexpression and improving the safety of the approach. We report the generation and in vitro validation of LVs encoding for murine GALC enzymes engineered to express alternative signal peptides to increase secretion and peptide domains to enhance blood-brain barrier (BBB) crossing. We show an advantage of chimeric GALC enzymes over the unmodified counterpart in terms of supraphysiological expression and secretion by GLD murine neural stem/progenitor cells (NSCs), HSCs, and progeny. Importantly, the secreted chimeric enzymes are recaptured and delivered to the lysosomes of GALC-deficient neural cells, which become metabolically cross-corrected. Of note, LVs encoding for chimeric human GALC enzymes safely and efficiently transduce human CD34+ HSCs. Preliminary results suggest increased secretion of the chimeric human GALC enzymes with respect to the unmodified counterpart and cross-correction of GLD human induced pluripotent stem cell-derived neurons/glia cells. The evaluation of the safety and therapeutic potential of these chimeric LVs in the GLD murine model in the context of HSC GT will pave the way to the clinical development of LV-based GT for this untreatable disorder.

Validazione in vitro di vettori lentivirali codificanti per enzimi GALC chimerici umani e murini per migliorare l'efficacia degli approcci di terapia genica per la leucodistrofia a cellule globoidi

La leucodistrofia a cellule globoidi (GLD) è una malattia da accumulo lisosomiale causata dalla carenza dell'enzima β -galattosilceramidasi (GALC), che comporta l'accumulo di substrati tossici nelle cellule mielinizzanti e conseguente grave disfunzione del sistema nervoso centrale e

periferico. Il beneficio terapeutico della terapia genica (GT) con cellule staminali ematopoietiche (HSC) trasdotte ex vivo con vettori lentivirali (LV) in LSD neurodegenerative è legato all'overespressione dell'enzima prodotto dalle cellule trasdotte e dalla distribuzione della proteina nei tessuti affetti. Nella GLD, la produzione di enzima da parte delle HSC trasdotte è modesta e risulta in una limitata biodisponibilità. Per questa ragione, enzimi GALC chimerici con un'aumentata biodisponibilità possono dare un vantaggio nel contesto della GLD, riducendo la necessità di un alto livello di overespressione dell'enzima e migliorando la sicurezza dell'approccio di GT. Abbiamo generato e validato in vitro LV che codificano per gli enzimi murini GALC ingegnerizzati per esprimere: I) peptide segnale alternativo, per aumentare la secrezione; II) domini peptidici, per incrementare l'attraversamento della barriera emato-encefalica (BBB). Abbiamo mostrato il vantaggio degli enzimi chimerici rispetto alla controparte non modificata in termini di overespressione e di secrezione dalle cellule staminali neurali (NSC) e HSC derivate dal modello animale GLD. Gli enzimi chimerici secreti vengono captati e portati al lisosoma delle cellule neurali GLD, determinando la cross correzione metabolica di queste cellule. Inoltre, LV che codificano per l'enzima GALC chimerico umano trasducono in modo sicuro ed efficiente le HSC umane. Risultati preliminari suggeriscono una maggiore secrezione degli enzimi chimerici rispetto alla controparte non modificata e la cross correzione delle cellule neuronali/gliali differenziate da cellule staminali pluripotenti umane derivate da pazienti GLD. La valutazione della sicurezza e del potenziale terapeutico di questi LV chimerici nel modello murino GLD nel contesto di HSC GT saranno cruciali in prospettiva del suo sviluppo clinico.

Disease Name:

Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe disease)

Nome malattia:

Leucodistrofia a cellule globoidi (Malattia di Krabbe)

Project number:

TGT22C10

89. ALTERATION OF LIPID METABOLISM IN THE PATHOGENESIS OF HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA: UNRAVELLING THE MECHANISMS TO RECOVER CELL FUNCTION.

Sonda S.^[1], Ongaro A.^[2], Bertocco A.^[1], Simonato M.^[3], Mattarei A.^[2], Santalla M.*^[4], Pendin D.^[4]

^[1]Dept. of Biomedical Sciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[2]Dept. of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[3]Fondazione Istituto di Ricerca Pediatrica "Città della Speranza" ~ Padova ~ Italy, ^[4]Neuroscience Institute - CNR ~ Padova ~ Italy

Hereditary Spastic Paraplegias (HSPs) are a group of inherited neurologic disorders in which lower extremity weakness and spasticity are the predominant symptoms. HSPs are characterized by high genetic heterogeneity[1]. Nevertheless, alterations in morphology or distribution of the Endoplasmic Reticulum (ER) appear to be a critical pathogenic factor[2]. Mutations in two genes encoding crucial enzymes to the plasmalogens (PLs) biosynthetic pathway, i.e., SPG81[3,4]and SPG82[5], have been recently identified in HSP patients. 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[6]. Notably, PLs amount was found decreased in several neurological diseases[7], suggesting that PLs could play a role in neuronal membranes welfare. PE-PLs are suggested to promote the formation of inverted hexagonal phases[8], thus facilitating membrane fusion events[9]. However, the sub-molecular details behind the above properties are

not fully understood. We aim at identifying a potential role for PLs in the remodeling of ER membranes. Our hypothesis is that manipulating ER membrane lipid composition in a way that favors membrane dynamics, we could rescue HSP-related ER morphology defects. Our goal is to test if administration of bioavailable PLs precursors to validated HSP fly models is able to increase the amount of membrane PLs, and to improve HSP-related phenotypes (birth rate, survival rate, and locomotor ability). The validated approach could prove a new therapeutic option for HSPs and potentially for other neurodegenerative diseases involving phospholipid-related membrane impairment.

Le Paraplegie Spastiche Ereditarie (PSE) sono un gruppo di disordini neurologici ereditari caratterizzati da debolezza e spasticità degli arti inferiori. Nonostante le PSE presentino un'elevata eterogeneità a livello genetico, alterazioni della morfologia e della distribuzione del Reticolo Endoplasmatico (RE) appaiono come un fattore critico nella patogenesi della malattia. In alcuni pazienti sono state recentemente identificate mutazioni nei geni SPG81 e SPG82, codificanti enzimi fondamentali per la biosintesi dei plasmalogeni (PL). I PL sono fosfolipidi abbondanti nel RE e, in particolare, nelle membrane del sistema nervoso. 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. Inoltre, diversi studi hanno suggerito che i PL abbiano un ruolo nel rimodellamento delle membrane biologiche; tuttavia, la loro funzione specifica non è ancora stata chiarita. Il nostro progetto si propone di elucidare il ruolo dei PL nel rimodellamento delle membrane del RE. La nostra ipotesi è che la manipolazione della composizione lipidica delle membrane possa recuperare i difetti nella struttura del RE riscontrati nelle PSE. Attraverso l'utilizzo di modelli di PSE generati in *Drosophila melanogaster*, ci poniamo l'obiettivo di verificare se la somministrazione di precursori biodisponibili di PL sia capace di aumentare la quantità di PL presenti nelle membrane e di recuperare la sintomatologia tipica della malattia. Questo approccio potrebbe fornire una nuova via terapeutica per i pazienti affetti da PSE e, potenzialmente, per il trattamento di altri disturbi neurodegenerativi caratterizzati da alterati livelli di fosfolipidi di membrana.

Disease Name:

Hereditary Spastic Paraplegia

Nome malattia:

Paraplegia Spastica Ereditaria

Project number:

GGP19304

90. TARGETING SPASTIN PROTEIN DEGRADATION FOR HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA (HSP) TREATMENT

Sardina F.^[1], Carsetti C.^[1], Fattorini G.^[1], Giorgini L.^[1], Grierson A.^[2], Cestra G.^[1], Rinaldo C.*^[1]

^[1]IBPM-CNR ~ Roma ~ Italy, ^[2]University of Sheffield ~ Sheffield ~ United Kingdom

HSP is a neurodegenerative disease characterized by weakness and spasticity of lower limbs. The most common type of HSP is due to haploinsufficient mutations in the SPG4 gene, encoding spastin, a microtubule severing enzyme, that controls cytokinesis, endosomal traffic, lipids droplets homeostasis and axonal transport. The knowledge about SPG4-HSP pathogenesis is progressively growing and spastin-elevating approaches are emerging as promising therapeutic approaches (ref. 1,2).

In the last few years, we identified an actionable pathway that regulates spastin poly-ubiquitin

mediated degradation, demonstrating that it is possible to restore spastin levels and rescue pathological phenotype by pharmacologically blocking its degradation (ref. 3).

Thanks to Telethon support, we started to characterize the spastin degradation pathway and we found that the druggable DDB1-Cullin-4a-Ring ubiquitin ligase complex (CRL4a; ref.4) promotes spastin poly-ubiquitylation and proteasomal-mediated degradation in cellular and in vivo model for HSP (manuscript in preparation). Notably, we showed that the silencing of Cullin 4 is able to rescue synapse structure/function and locomotor defects in spastin-deficient *Drosophila* flies. We are now identifying all the members of the CRL4a, focusing our attention on the substrate receptor that specifically recruits spastin for ubiquitylation. To functionally validate the role of each member of this complex in vivo, we will continue to exploit spastin-deficient *Drosophila* flies.

Ongoing investigations will also be presented to show the different possibilities of inhibiting spastin degradation by acting at different levels: 1) using the neddylation inhibitor MLN4924, a CNS penetrant drug, which is currently in several oncological clinical trials; 2) exploiting already existing inhibitors of the CRL4 core complex; and 3) developing novel targeted approaches to specifically inhibit the interaction between spastin and its substrate receptor.

innalzare I livelli di spastina mediante inibizione della sua degradazione: un possibile approccio terapeutico per la paraplegia spastica ereditaria (HSP)

La paraplegia spastica ereditaria (HSP) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da spasticità progressiva degli arti inferiori. Il tipo comune è dovuto a mutazioni nella spastina, una proteina coinvolta nella divisione cellulare e nel trasporto assonale. Diversi studi dimostrano che è fondamentale avere la giusta quantità di spastina funzionante nelle cellule. Ad oggi, non esistono terapie curative e approcci per gestire la progressione della HSP. Tuttavia, recenti scoperte indicano che il ripristino del corretto dosaggio di spastina potrebbe essere utile per i pazienti HSP con deficit di spastina (ref, 1,2). Per sviluppare approcci terapeutici che mirano a recuperare i livelli di spastina funzionante è fondamentale studiare in dettaglio i meccanismi che ne regolano i livelli proteici. Il nostro gruppo di ricerca ha identificato e caratterizzato una nuova via regolativa che controlla i livelli di spastina. Abbiamo dimostrato che è possibile ripristinare il dosaggio appropriato di spastina impedendo la sua degradazione (ref.3). Grazie al sostegno di Telethon, abbiamo individuato diversi bersagli (ref. 4) su cui agire farmacologicamente per bloccare la degradazione di spastina. Stiamo ora 1) valutando gli effetti di questi approcci in modelli di HSP che ricapitolano i difetti patologici umani e 2) effettuando un ulteriore approfondimento sui fattori molecolari coinvolti nella regolazione di questa proteina (manoscritto in preparazione). La possibilità di agire su molteplici bersagli per bloccare la degradazione di spastina rende particolarmente promettente la prospettiva di un'applicazione terapeutica dei nostri studi.

Disease Name:

Hereditary Spastic Paraplegia

Nome malattia:

Paraplegia Spastica Ereditaria

Project number:

GGP20040

91. REGULATING THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE FOR TREATING HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA TYPE 7 (SPG7)

Franchini E.*^[1], Marafelli I.^[2], Paulikova K.^[1], Giacomello M.^[3], Covello G.^[3], Berno V.^[4], Cammarota E.^[4], Sambri I.^[5], Massa F.^[1], Casari G.^[2]

^[1]Genome- Phenome Relationship Unit, Division of Genetics and Cellular Biology, San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy, ^[2]Genome- Phenome Relationship Unit, Division of Genetics and Cellular Biology, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy and Vita-Salute San Raffaele University ~ Milano ~ Italy, ^[3]University of Padua ~ Padova ~ Italy, ^[4]Experimental imaging Center, ALEMBIC, IRCCS -Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy, ^[5]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli-Napoli ~ Italy

Our recent results causally associate mutations of the mitochondrial protein paraplegin to defective mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and ultimately to hereditary spastic paraplegia (HSP) type 7 (SPG7). Intermittent fast opening and closing of the pore, defined as the mPTP flickering, is essential for mitochondrial homeostasis, as it allows to finely reduce intra-matrix concentration of Ca²⁺ and reactive oxygen species, and associates with a momentarily rapid loss of mitochondrial membrane potential, soon re-established.

We demonstrated that SPG7 patient cells and cortical neurons of the Spg7^{-/-} mouse model have a defect of mPTP flickering, which is restored, together with the in vivo motor dysfunction, by treatment with the benzodiazepine Bz423. Unfortunately, Bz423, a known inducer of mPTP opening, is not an approved drug and also exerts an unwanted pro-apoptotic activity.

Building on this new and original information, we propose conducting a high content screening of EMA/FDA approved drugs to identify active compounds devoid of BZ423's undesirable activity, but active as flickering facilitators, as a repurposing therapeutic strategy for SPG7. In addition, the knowledge of the topological interaction between Bz423 and its target OSCP allows defining a pharmacophore model that will be used to identify mPTP-active molecules from a large library of compounds.

This two-pronged approach leverages the setup of the fluorescence-based biological assay for mPTP flickering that we developed and our in vitro and in vivo models for confirming the new drug effectiveness and characterizing the possible side effects with the prospect of a pilot clinical trial for SPG7 patients.

Regolazione farmacologica del poro mitocondriale come terapia per la paraplegia spastica ereditaria di tipo 7 (SPG7)

La paraplegia spastica ereditaria di tipo 7 (SPG7) è una malattia genetica neurologica rara, tipicamente con esordio nell'età adulta, caratterizzata da progressiva debolezza e spasticità delle gambe, oltre ad altri sintomi nelle forme complicate, che risultano in una cattiva qualità di vita. Sono disponibili solo trattamenti sintomatici con farmaci miorilassanti, riabilitazione funzionale e kinesiterapia.

Proponiamo di cercare farmaci candidati per i pazienti con SPG7, partendo dalla nostra recente scoperta che le mutazioni della proteina mitocondriale paraplegina, che causa SPG7, sono associate ad un'attività difettosa, chiamata sfarfallio, del poro mitocondriale (mPTP).

Abbiamo dimostrato che le cellule del paziente SPG7 e i neuroni corticali del modello murino Spg7^{-/-} hanno uno sfarfallio difettoso che viene ripristinato, insieme alle disfunzioni motorie in vivo, dal trattamento con Bz423, un noto induttore dell'apertura dell'mPTP che non è un farmaco approvato ed esercita effetti collaterali indesiderati.

Basandoci su queste informazioni originali, proponiamo di effettuare uno screening ad alto contenuto (HCS) di farmaci approvati da EMA/FDA per identificare composti privi dell'attività indesiderabile di Bz423, ma attivi sullo sfarfallio. Inoltre, le conoscenze sull'interazione tra Bz423 e il suo bersaglio mitocondriale consentono un secondo approccio di screening basato sulla modellizzazione molecolare per identificare altre molecole attive su mPTP a partire da un'ampia

libreria di composti.

Sfruttando il test biologico per lo sfarfallio di mPTP che abbiamo sviluppato e i nostri modelli in vitro e in vivo, convalideremo l'efficacia del nuovo farmaco e caratterizzeremo i possibili effetti collaterali nella prospettiva di uno studio clinico pilota per pazienti con SPG7.

Disease Name:

Hereditary Spastic Paraplegia, tipo 7

Nome malattia:

Paraplegia Spastica Ereditaria, tipo 7

Project number:

GMR22T2019

92. DELVING INTO THE MECHANISMS UNDERLYING HPDL-RELATED DISORDERS WITH A MULTI-MODEL APPROACH

Damiani D.*^[1], Naef V.^[1], Desbats M.A.^[2], Galatolo D.^[1], Mero S.^[1], Zampieri S.^[2], Baggiani M.^[1], Tessa A.^[1], Salviati L.^[3], Santorelli F.M.^[1]

^[1]IRCCS FONDAZIONE STELLA MARIS ~ PISA ~ Italy, ^[2]GENETICS-UNIVERSITY OF PADOVA ~ PADOVA ~ Italy, ^[3]Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza (IRP) ~ Padova ~ Italy

Hereditary spastic paraplegias (HSP) are inherited rare disorders mainly affecting the corticospinal neurons in pure and complex forms. Over 80 genes are currently associated with HSPs. In complex forms, the disease often overlap with cerebellar ataxia, peripheral neuropathy, optic atrophy, and cerebral palsy (CP).

Mutations in HPDL, the gene encoding the T-dark protein 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like, have been associated with a combination of neurodevelopmental disorder with progressive spasticity, epilepsy, brain atrophy, and white matter abnormalities. In vivo studies related to HPDL disease show several limitations related to early lethality in mice and transient effects in zebrafish, while non-neural systems as commonly used cellular lines cannot suffice to explore HPDL-related conditions. Recent investigations suggest that in multicellular eukaryotes HPDL is involved in the synthesis of 4-hydroxybenzoate, the precursor of the quinone ring of Coenzyme Q10 (CoQ10).

The central hypotheses of this project are that HPDL is involved in brain development, its ablation leads to a spectrum of disorders wider than those already known, and that alterations of CoQ10 biosynthetic pathways are involved in these processes. Hence, our objectives aim to employ in vitro and in vivo systems to study HPDL in neural development, to shed new light on the CoQ10-HPDL liaison, and to attempt rescuing HPDL phenotype in our models through compounds with an active role in the CoQ10 biosynthetic pathway.

To do this, we will use cellular models as HPDL KO neural cell lines, iPSC-derived cortical neurons, and 3D cerebral organoids. iPSCs will be derived from somatic cells taken from newly identified patients. HPDL null zebrafish and knock-in nematode models will be also used for in vivo experiments and to test novel pharmacological approaches.

Our final goal will be to translate our findings in the clinic, in a bench-to-bedside perspective.

STUDIO DI MODELLI MULTIPLI DI UNA NUOVA FORMA DI PARAPLEGIA SPASTICA, SPG83

Le paraplegie spastiche ereditarie (HSP) sono disturbi rari ereditati che colpiscono principalmente i neuroni corticospinali. Oltre 80 geni sono noti e la malattia si sovrappone spesso ad atassia cerebellare, neuropatia periferica, atrofia ottica e paralisi cerebrale.

Mutazioni in HPDL, il gene che codifica la proteina 4-idrossifenilpiruvato diossigenasi-like, sono state associate a una combinazione di disturbi del neurosviluppo che ricordano la paralisi cerebrale infantile e le malattie mitocondriali (SPG83). Recenti studi suggeriscono che HPDL è coinvolto nella sintesi Coenzima Q10 (CoQ10).

Le ipotesi centrali di questo progetto multicentrico sono che HPDL sia coinvolto nello sviluppo del cervello, che la sua perdita porti a uno spettro di disturbi clinici più ampio di quelli già noti e che le alterazioni delle vie biosintetiche del CoQ10 siano coinvolte in questi processi.

I nostri obiettivi sono quindi quelli di utilizzare sistemi di laboratorio in vitro (cellule, neuroni derivati da fibroblasti cutanei, organoidi) ed in vivo (modelli knock-out in zebrafish e knock-in nel nematode) per studiare meglio il legame CoQ10-HPDL e tentare di testare nuovi approcci farmacologici.

L'obiettivo finale sarà tradurre i nostri risultati in clinica, al letto del paziente.

Disease Name:

Hereditary Spastic Paraplegia, type 83

Nome malattia:

Paraplegia Spastica Ereditaria, tipo 83

Project number:

GJC21131

93. MODULATION OF PRE- AND POST-SYNAPTIC ADAM10 AND ITS CONTRIBUTION IN HUNTINGTON'S DISEASE CORTICO-STRIATAL DYSFUNCTION

Scolz A., Cattaneo E., Zuccato C.*

Department of Biosciences, University of Milano and Istituto Nazionale di Genetica Molecolare ~ Milano ~ Italy

Huntington's Disease (HD) is a dominant neurodegenerative disorder caused by an expansion of a CAG repeat tract in exon 1 of the Huntingtin gene (HTT;1). Since HD is a monogenic disease, the most promising therapeutic approaches rely on reducing mutant HTT (muHTT) through antisense oligonucleotides (ASO)(2). Unfortunately, the recent failure of ASO candidates in clinical trials highlighted potential problems and new challenges for HTT-lowering strategies. Despite enormous efforts from scientists, clinicians and pharmaceutical companies, we continue to be in the urgent need for groundbreaking therapies.

HD is characterized by the early dysfunction of the cortico-striatal circuitry (3). MuHTT-induced phenotypes appear both in cortical and striatal neurons, but in vivo and in vitro studies have shown that selective muHTT expression in cortical neurons is sufficient to alter the cortico-striatal circuitry functionality and to cause striatal pathology (4;5). Hence, the cortex represents a very attractive site of action for developing new therapeutic approaches for HD.

A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) is one of the most widely expressed proteases in the human brain (6). By cleaving trans-synaptic proteins ADAM10 plays fundamental roles in the homeostasis of glutamatergic networks. We found that wild-type HTT regulates glutamatergic synapse remodeling through binding to ADAM10 and inhibition of its proteolytic activity on N-Cadherin (7). On the contrary, muHTT binds less to the active enzyme, which accumulates at the post-synapse, causing excessive N-Cadherin proteolysis, synapse loss, and cognitive decline in HD mice (7). More recently, by studying the ADAM10 interactome in the wild-type and HD brain, we revealed that ADAM10 shares presynaptic protein partners with HTT, including molecules implicated in vesicle transport (KIF5C, DynC1H1) and release (Bassoon,

Piccolo, Erc2, Liprin- α 3) (8). We also found a decrease in the binding of active ADAM10 to Piccolo and reduced density of synaptic vesicles ready for release in the HD cortex. The observed presynaptic defects were prevented by genetic strategies that normalized active ADAM10 in the HD brain (8).

These findings led us to hypothesize that defects of the cortico-striatal circuitry and striatal pathology in HD could depend on muHTT toxic effect on presynaptic ADAM10 in the cortical afferents.

To test this hypothesis, we reproduced the HD cortico-striatal circuitry in vitro by using microfluidic chamber co-cultures. The ADAM10 inhibitor GI254023X was administered to cortical and striatal neurons independently within the reconstituted network and cortico-striatal connectivity was assessed. We also investigated the binding between ADAM10 and proteins implicated in vesicle trafficking and release in wild-type and HD cortical neurons.

RUOLO DELL' ENZIMA ADAM10 NELLA MALATTIA DI HUNTINGTON

La Corea di Huntington è una malattia del cervello di origine ereditaria. Il gene alla base della patologia è noto ed è chiamato gene Huntington. Al suo interno è stata identificata una sequenza di triplette CAG che si ripetono l'una dopo l'altra. La mutazione che causa la malattia consiste nell'espansione del numero di triplette oltre la soglia limite di 36. I sintomi sono movimenti involontari, deterioramento cognitivo ed alterazione del comportamento.

La malattia di Huntington colpisce prevalentemente i neuroni della corteccia e dello striato. Queste due aree cerebrali sono collegate tramite la via cortico-striatale in cui i neuroni della corteccia inviano proiezioni per connettersi ai neuroni dello striato. Il gene mutato altera la funzionalità della via cortico-striatale fin da stadi molto precoci. Identificare farmaci che agiscono su questo circuito per ripristinarne la corretta attività è uno dei principali obiettivi della ricerca. Diversi studi hanno recentemente dimostrato che basta esprimere il gene mutato nei neuroni della corteccia per alterare la funzionalità dell'intero circuito cortico-striatale e causare perdita di cellule nervose nello striato. Curare la corteccia, pertanto, potrebbe essere un nuovo modo per contrastare i difetti di circuito e il danno striatale.

Questo progetto si focalizza su ADAM10, un enzima critico per la funzionalità dei circuiti cerebrali. I nostri dati indicano che il gene Huntington, nella versione sana, regola l'attività di ADAM10 nel cervello. Quando, invece, muta i livelli di enzima attivo aumentano e ciò contribuisce a danneggiare le connessioni fra neuroni. La nostra ipotesi è che l'aumentata attività dell'enzima ADAM10 in corteccia possa da sola essere responsabile dei difetti di circuito e della neurodegenerazione striatale.

Durante il primo anno del progetto abbiamo lavorato per riprodurre e caratterizzare in vitro il circuito cortico-striatale Huntington. Abbiamo, inoltre, messo a punto un protocollo sperimentale per inibire ADAM10 solo nei neuroni corticali e valutato se questo trattamento fosse in grado di prevenire i danni all'intero circuito e la degenerazione dei neuroni striatali.

Disease Name:

Huntington's Disease

Nome malattia:

Malattia di Huntington

Project number:

GGP20067

94. METABOLISM OF POLYSIALIC ACID: NEW INSIGHT INTO PATHOLOGICAL MECHANISMS AND POTENTIAL TREATMENTS FOR HUNTINGTON'S DISEASE

Pepe G.*^[1], Capocci L.^[1], Marracino F.^[1], Moons S.J.^[2], Sönmez A.^[3], Switonska--Kirkowska K.^[4], Scarselli P.^[1], Pizzati L.^[1], Figiel M.^[4], Boltje T.J.^[2], Parlato R.^[5], Di Pardo A.^[1], Maglione V.^[1]

^[1]IRCCS Neuromed ~ Pozzilli ~ Italy, ^[2]Cluster of Molecular Chemistry, Institute for Molecules and Materials, Radboud University Nijmegen ~ Nijmegen ~ Netherlands, ^[3]Institute of Applied Physiology, Ulm University ~ Ulm ~ Germany, ^[4]Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences ~ Poznań ~ Poland, ^[5]Division for Neurodegenerative Diseases, Department of Neurology, Mannheim Center for Translational Neuroscience, Medical Faculty Mannheim Heidelberg University ~ mannheim ~ Germany

Sialic acid (Sia) is nine-carbon acidic monosaccharide which occurs naturally at the end of sugar chains attached to the surfaces of cells and soluble molecules.

Evidence indicates that defective metabolism of sialic acid-containing glycosphingolipids (gangliosides) may play a critical role in the pathogenesis of Huntington's disease (HD).

Besides forming gangliosides, sialic acid (Sia) occurs naturally at the end of sugar chains attached to the cell surface and soluble proteins. In particular, polysialic acid (polySia), a Sia polymer, represents a post-translational modification of mainly the neural cell adhesion molecule (NCAM), which is particularly important for brain development, myelin formation and stability as well as synaptic stability and function.

The aim of this study was to investigate whether the metabolism of polySia was impaired in HD and may eventually represent a new hallmark of the disease.

In vitro experiments were carried out in immortalized mouse striatal-derived knock-in cells expressing endogenous levels of Htt (STHdh) and human-derived inducible stem cells (iPSC) from both control and HD subjects. All in vivo studies were performed in both zQ175 and R6/2 HD mice and in age-matched control littermates.

Our findings clearly demonstrated that:

1. PolySia metabolism is defective in different HD settings, including human iPSCs and two different HD mouse models.
2. Brain polySia levels are reduced early in the disease course in HD mice even at embryonic stage of the development.
3. Huntingtin regulates NCAM polysialylation.
4. Treatment with a high cell permeant Sia derivative (PNANA) is therapeutically effective in HD mice by preserving motor performance and ameliorating neuropathology.

Our findings indicate that the reduction of polySia is a new hallmark of the disease and its metabolism may represent a druggable target.

Il metabolismo dell'acido polisialico: nuove conoscenze sui meccanismi patologici e potenziali trattamenti per la Malattia di Huntington

Diversi studi dimostrano che il metabolismo difettoso dei lipidi che contengono lo zucchero denominato "acido sialico" (gangliosidi) può svolgere un ruolo importante nella patogenesi della Malattia di Huntington (MD).

Oltre a formare i gangliosidi, l'acido sialico (Sia) si può trovare naturalmente all'estremità delle catene di zucchero attaccate alla superficie cellulare e alle proteine solubili. In particolare, l'acido polisialico (polySia), un polimero di Sia, rappresenta una modifica post-traduzionale della molecola di adesione delle cellule neurali (NCAM), che è particolarmente importante per lo sviluppo del

cervello, la formazione e la stabilità della mielina, nonché la stabilità e la funzione sinaptica. L'obiettivo di questo studio è stato quello di indagare se il metabolismo della polySia fosse alterato nella MH e se potesse eventualmente rappresentare un nuovo segno caratteristico della malattia.

A questo scopo, sono stati condotti esperimenti in vitro su cellule MH di origine murina (STHdh) e cellule staminali inducibili di origine umana (iPSC) derivanti da soggetti con MD. Gli studi in vivo sono stati eseguiti sui modelli murini zQ175 e R6/2 HD e su topi di controllo della stessa età.

I nostri risultati hanno chiaramente dimostrato che:

1. Il metabolismo di PolySia è difettoso in diversi modelli MH, comprese le iPSC umane e due diversi modelli murini di MH.
2. I livelli di polySia cerebrale sono ridotti all'inizio del decorso della malattia nei topi MH anche nella fase embrionale dello sviluppo.
3. La proteina huntingtina, responsabile della MH, regola la polisialilazione di NCAM.
4. Il trattamento con un derivato di acido sialico (PNANA), altamente capace di penetrare le cellule, è efficace nei topi MH migliorandone la neuropatologie e mitigando la disfunzione motoria.

I nostri risultati indicano che la riduzione della polySia è un nuovo segno caratteristico della malattia e il suo metabolismo può rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico.

Disease Name:

Huntington's Disease

Nome malattia:

Malattia di Huntington

Project number:

GGP20101

95. A GENOME-WIDE SCREENING IN PLURIPOTENT CELLS IDENTIFIES MTF1 AS A NOVEL SUPPRESSOR OF MUTANT HUNTINGTIN TOXICITY

Ferlazzo G.M.^[1], Gambetta A.M.^[2], Amato S.^[2], Cannizzaro N.^[1], Angiolillo S.^[1], Carbognin E.^[2], Arboit M.^[1], Diamante L.^[2], Romani P.^[1], Galimberti E.^[3], Pflug F.^[3], Luoni M.^[4], Giannelli S.^[4], Pepe G.^[5], Capocci L.^[5], Di Pardo A.^[5], Broccoli V.^[4], Leeb M.^[3], Moro E.^[1], Maglione V.^[5], Martello G.*^[2]

^[1]Department of Molecular Medicine, Medical School, University of Padua ~ Padua ~ Italy, ^[2]Department of Biology, University of Padova ~ Padua ~ Italy, ^[3]Max Perutz Laboratories Vienna, University of Vienna, Vienna Biocenter ~ Vienna ~ Austria, ^[4]Division of Neuroscience, San Raffaele Scientific Institute, ~ Milan ~ Italy, ^[5]IRCCS Neuromed ~ Pozzilli ~ Italy

Huntington's disease (HD) is an inherited and incurable neurodegenerative disorder caused by CAG repeat expansions in the huntingtin (HTT) gene. The resulting mutant HTT protein alters cellular physiology at multiple levels, inducing toxicity and cell death. The mechanisms directly causing toxicity are partially understood, thus precluding the development of effective therapeutic strategies. Here we developed a novel method for the identification of novel suppressors of mutant HTT toxicity

by performing a genome-wide screen in pluripotent stem cells, followed by hit validation both in zebrafish and mouse HD models. The candidate suppressors identified were strongly enriched for HD-associated processes. To further validate our approach, we focused on one of our candidates, Metal regulatory transcription factor 1 (MTF1), a transcription factor controlling metal homeostasis in the cell. Forced expression of Mtf1 counteracts cell death, oxidative stress and transcriptional alterations caused by mutant HTT in pluripotent cells. In zebrafish, Mtf1 reduces malformations and apoptosis induced by mutant HTT, while Mtf1 delivery by Adeno-Associated viral (AAV) vectors ablated motor defects observed in an HD mouse model. The method we developed allows to

swiftly go from in vitro identification of genes with therapeutic potential to their validation in preclinical model, and it can be easily adapted to other neurodegenerative and monogenic diseases.

Identificazioni di geni in grado di proteggere le cellule dalla huntingtina mutante.

La corea, o malattia di Huntington è una malattia neurodegenerativa ereditaria e incurabile causata da una espansione del numero di triplette CAG nel gene huntingtina (HTT). La risultante proteina HTT mutante altera la fisiologia cellulare a più livelli, inducendo tossicità e morte cellulare. I meccanismi che causano direttamente la tossicità sono parzialmente compresi, precludendo così lo sviluppo di strategie terapeutiche efficaci. Abbiamo utilizzato delle cellule staminali per cercare dei geni in grado di contrastare gli effetti tossici causati da HTT mutante. Abbiamo identificato numerosi geni con tale attività, ma abbiamo deciso di concentrarci su uno di essi, chiamato MTF1. MTF1 è un fattore che controlla i livelli di metalli della cellula, poiché è noto che un accumulo eccessivo di alcuni metalli sia tossico. Abbiamo visto che aumentare artificialmente i livelli di MTF1 protegge le cellule staminali dalla morte e dallo stress ossidativo. Abbiamo poi sviluppato un modello animale di malattia di Huntington, usando il pesce zebra. La presenza di HTT mutante causa malformazioni e morte cellulare nel cervello del pesce zebra. Questi effetti sono contrastati da MTF1. Infine, in un topo che sviluppa la malattia di Huntington, abbiamo visto che somministrare MTF1, mediante terapia genica, corregge i difetti motori ed alcune alterazioni molecolari nel cervello, tipicamente associate alla malattia di Huntington. Il metodo che abbiamo sviluppato consente di passare rapidamente dall'identificazione di geni con potenziale terapeutico alla loro validazione in modelli animali, anche detti modelli preclinici, e può essere facilmente adattato ad altre malattie neurodegenerative e monogeniche.

Disease Name:

Huntington's Disease

Nome malattia:

Malattia di Huntington

Project number:

GJC21157

96. DEVELOPMENT OF AN EPIGENETIC EDITING STRATEGY FOR THE TREATMENT OF HUNTINGTON'S DISEASE.

Cappelluti M.A.*, Coglot A., Lombardo A.

San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Huntington's Disease (HD) is a fatal disorder caused by mutations in the Huntingtin (HTT) gene. In healthy individuals, the sequence of the HTT gene contains 10 to 26 repetitions of the same three DNA letters, namely CAG. Conversely, in Huntington patients, these repetitions exceed the number of 37. This expansion determines the acquisition of toxic functions, finally leading to the loss of neurons, a relevant cell type in the nervous system. In the last two decades, several approaches have been developed to treat HD, either by inhibiting the messenger that leads to the production of the mutated HTT protein or by inactivating the gene itself. Although promising data were obtained in pre-clinical studies, these strategies were either poorly effective in patients or may fail to reach clinical testing due to potential risks associated to these treatments. In this project, we aim at developing a novel strategy to inactivate the mutated HTT gene, which promises to be more effective and safer than the previous ones. Particularly, we will use epigenome editing to alter the

code that regulates activity of the mutated HTT gene, such that this gene would not be expressed anymore in the cells. We will conduct studies in relevant models of HD to prove the efficacy and safety of this novel therapeutic strategy.

SVILUPPO DI UNA STRATEGIA DI EDITING EPIGENETICO PER IL TRATTAMENTO DELLA COREA DI HUNTINGTON

La malattia di Huntington (MH) è una malattia fatale causata da mutazioni nel gene Huntingtin (HTT). In individui sani, la sequenza del gene HTT contiene da 10 a 26 ripetizioni delle stesse tre lettere del DNA, CAG. Al contrario, nei pazienti con Huntington, queste ripetizioni superano il numero di 37. Questa espansione determina la produzione di una proteina tossica, portando infine alla perdita di neuroni, un tipo cellulare rilevante nel sistema nervoso. Negli ultimi due decenni sono stati sviluppati diversi approcci per il trattamento della MH, inibendo la produzione della proteina HTT mutata o inattivando il gene stesso. Sebbene negli studi preclinici siano stati ottenuti dati promettenti, queste strategie sono risultate scarsamente efficaci nei pazienti o potrebbero non raggiungere i test clinici a causa dei potenziali rischi associati a questi trattamenti. In questo progetto, miriamo a sviluppare una nuova strategia di inattivazione del gene HTT mutato, potenzialmente più efficace e più sicura delle precedenti. In particolare, utilizzeremo l'editing epigenetico per alterare il codice che regola l'attività del gene HTT mutato, in modo tale che questo gene non sia più espresso nelle cellule. Condurremo studi in modelli rilevanti di MH per dimostrare l'efficacia e la sicurezza di questa nuova strategia terapeutica.

Disease Name:

Huntington's Disease

Nome malattia:

Malattia di Huntington

Project number:

TGT22C12

97. NEUROPATHOLOGICAL FEATURES OF PARKIN R275W MOUSE MODEL

Zanetti L.*^[1], Fenech A.^[1], Regoni M.^[1], Sevegnani M.^[2], Pischedda F.^[2], Domenicale C.^[3], Albanese F.^[3], Monzani E.^[1], Andrea C.^[4], Morari M.^[3], Piccoli G.^[2], Valtorta F.^[1], Sassone J.^[1]

^[1]Università Vita-Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[2]Università degli Studi di Trento ~ Trento ~ Italy, ^[3]Università degli Studi di Ferrara ~ Ferrara ~ Italy, ^[4]Istituto Auxologico Italiano ~ Milano ~ Italy

The PARK2 gene, encoding the PARKIN protein, is causative of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP), a neurodegenerative disorder that results in early, severe loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc)[1]. Since no therapy is available to prevent or slow the progression of the disease, the development of ARJP mechanistic animal models is essential to clarify molecular underpinnings of neurodegeneration, with the ultimate goal of developing neuroprotective strategies. With reference to this, several PARKIN models were generated in the past, but none of them was found to efficiently recapitulate both the genetics and the pathology of the disease. Aiming at filling in this gap, we created a new, innovative knock-in mouse model by inserting via CRISPR/Cas9 genome editing PARKIN R275W missense mutation, which is associated with the highest allelic frequency in PARK2 patients [2]. Characterization of this model showed age-dependent dopaminergic (DA) neurons degeneration in the SNc, progressive motor impairment, and accumulation of S129-phospho alpha-synuclein, showcasing an intriguing single-spot nuclear localization in SNc DA neurons. Furthermore, we found features of necroptosis, a recently described form of cell death [3] depending on receptor-

interacting serine-threonine kinase 3 (RIPK3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL). In conclusion, ParkinR275W model displays key features ARJP, providing an appropriate model for the study of the causative mechanism in the disease process and, building on this, for the development of neuroprotective therapies targeting the necroptosis pathway [4].

Mutazioni nel gene PARK2 causano il parkinsonismo giovanile a trasmissione autosomica recessiva (ARJP), una malattia neurodegenerativa caratterizzata dalla morte dei neuroni dopaminergici situati nella regione del cervello denominata substantia nigra pars compacta (SNc). Questa regione ha un ruolo importante nel controllo dei movimenti volontari. Poiché ad oggi nessuna terapia è disponibile per rallentare il processo neurodegenerativo in questi pazienti, lo sviluppo di modelli animali in grado di riepilogare il meccanismo molecolare della patologia è essenziale per chiarire le basi molecolari della neurodegenerazione, con l'obiettivo finale di sviluppare strategie neuroprotettive. Nostri dati preliminari, ottenuti in un modello murino portatore della mutazione missenso PARKIN R275W, evidenziano una progressiva compromissione motoria, un accumulo nucleare di fosfo-alfa-sinucleina S129 nei neuroni dopaminergici della SNc e indizi di attivazione del pathway di necroptosi. In conclusione, il modello ParkinR275W ricapitola le caratteristiche chiave del parkinsonismo giovanile, fornendo un modello appropriato per lo studio del meccanismo causativo del processo patologico e per lo sviluppo di potenziali terapie neuroprotettive aventi come target il pathway di necroptosi.

Disease Name:

Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism (ARJP)

Nome malattia:

Malattia di Parkinson a esordio giovanile (con modalità di trasmissione AR)

Project number:

GGP20048

98. THE ROLE OF MICROGLIA IN LAFORA DISEASE: CHARACTERISATION OF MICROGLIAL SIGNATURES AND SCREENING OF ANTI-INFLAMMATORY MOLECULES IN A NOVEL ZEBRAFISH MODEL.

Mero S.^[1], Ogi A.^[1], Licitra R.^[1], Damiani D.^[1], Ratto G.M.^[2], Nardi G.^[2], Imbrici P.^[3], Liantonio A.^[3], Santorelli F.M.^[1], Marchese M.^[1], Della Vecchia S.*^[1]

^[1]Department Neurobiology and Molecular Medicine - ZebraLab, IRCCS Fondazione Stella Maris ~ Pisa ~ Italy, ^[2]National Enterprise for Nanoscience and Nanotechnology (NEST), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)-Istituto Nanoscienze and Scuola Normale Superiore ~ Pisa ~ Italy, ^[3]Department of Pharmacy-Drug Sciences, University of Bari "Aldo Moro" ~ Bari ~ Italy

Lafora disease (LD) is a form of progressive myoclonic epilepsy characterised by the accumulation of polyglucosan bodies in several organs and tissues, including the brain. To date, there is no cure and the pathophysiology of the disease is only partially understood. We have previously generated a new zebrafish model of Lafora disease, *epm2a* KO (*epm2a*^{-/-}), which recapitulates the main features of the human disease, like the motor impairment and the seizure-like events [1]. Furthermore, *epm2a*^{-/-} larvae showed increased glycogen concentration, similar to that observed in laforin-deficient mice [2], increased apoptotic cell death and activation of early inflammatory responses. Neuroinflammation has emerged as a possible contributor to disease progression [3, 4]. However, the microglial population, the brain's main innate immune cells, is still poorly explored in LD. For this reason, we are currently focusing on the role of microglia in LD in particular to

assess its contribution to the epileptic phenotype observed in the epm2a KO zebrafish. The analysis of the morphology of microglial cells, as just started in the early developmental stages of our zebrafish model of LD disease, to detect possible changes compared to WT controls. Preliminary drug testing has just begun, targeting directly or indirectly pro-inflammatory pathways, with the intention of understanding whether they can rescue the disease phenotype of LD zebrafish model.

La malattia di Lafora (LD) è una forma di epilessia mioclonica progressiva caratterizzata dall'accumulo di corpi di Lafora in diversi organi e tessuti, compreso il cervello. Nonostante i numerosi progressi, rimane ad oggi una condizione incurabile con fisiopatologia solo parzialmente compresa. In precedenza, abbiamo generato un nuovo modello di zebrafish di LD, epm2a KO (epm2a^{-/-}), che ricapitola le principali caratteristiche della malattia umana, come la compromissione motoria e l'epilessia [1]. Inoltre, le larve epm2a^{-/-} hanno mostrato un aumento della concentrazione di glicogeno, simile a quello osservato nei topi carenti di laforina [2], un aumento della morte cellulare apoptotica, una compromissione della autofagia e l'attivazione di risposte infiammatorie precoci. La neuroinfiammazione è emersa recentemente come possibile responsabile della progressione della malattia [3, 4]. Tuttavia, le cellule microgliali, le principali cellule immunitarie innate del cervello, risultano ancora poco esplorate nella LD. Per questo motivo, attualmente ci stiamo concentrando sul ruolo della microglia nella LD, per valutare in maniera approfondita il contributo di queste cellule al fenotipo epilettico osservato nello zebrafish epm2a KO. Abbiamo iniziato l'analisi della morfologia delle cellule microgliali, nelle prime fasi di sviluppo del nostro modello di zebrafish di LD, con lo scopo di individuare eventuali cambiamenti morfologici rispetto ai controlli WT. Recentemente abbiamo iniziato anche la sperimentazione preliminare di farmaci che agiscono direttamente o indirettamente sulle vie pro-infiammatorie, con l'intento di verificare se sono in grado di recuperare il fenotipo patologico del modello di zebrafish LD.

Disease Name:

Lafora Disease

Nome malattia:

Malattia di Lafora

Project number:

GSA22B005

99. DISSECTING THE MECHANISMS OF MYELOID-TO-NEURAL ENZYMATIC CROSS-CORRECTION IN THE CONTEXT OF HEMATOPOIETIC STEM CELL GENE THERAPY FOR METACHROMATIC LEUKODYSTROPHY

Meneghini V.*^[1], Calbi V.^[1], Piccoli M.^[2], Morena F.^[3], Rossomanno I.^[1], Laface I.^[1], Ghiroldi A.^[2], Sabata M.^[3], Anastasia L.^[2], Aiuti A.^[1], Gritti A.^[1]

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[2]Stem Cells for Tissue Engineering Laboratory, IRCCS Policlinico San Donato ~ Milan ~ Italy, ^[3]Department of Chemistry, Biology and Biotechnologies, University of Perugia ~ Perugia ~ Italy

Metachromatic Leukodystrophy (MLD) is an autosomal recessive disease caused by defects in Arylsulfatase A (ARSA), a lysosomal enzyme that degrades sulfatides. Neurological manifestations include white matter signs in the central and peripheral nervous systems (CNS, PNS), seen as neuroinflammation and neurodegeneration. Ex vivo hematopoietic stem cell gene therapy (HSC GT) using autologous HSCs engineered by lentiviral vectors (LV) to express supraphysiological

ARSA levels provides superior benefit to MLD patients as compared to conventional allogeneic HSC transplant (HSCT). While the key role of metabolically-competent HSC myeloid progeny in providing immunomodulation and neuroprotection is recognized, the exact mechanism of myeloid-mediated enzymatic cross-correction of MLD neural cells is unclear.

Here, we showed that the ARSA enzyme released by LV.ARSA-transduced MLD monocyte-derived macrophages cross-correct enzyme-deficient neurons and glial cells derived from MLD patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs). ARSA over-expression did not impact on the survival and M1/M2 differentiation potential. Also, M1/M2 macrophage polarization did not influence ARSA production and secretion, leading to a comparable ARSA uptake in MLD neurons and glia through mechanisms that are mediated, at least in part, by the mannose-6-phosphate receptor. Indeed, our data in human myeloid cell lines suggest that the transgenic ARSA enzyme is post-transcriptionally modified through the phosphorylation of mannose-6 residues.

Taking advantage of unique in vitro human disease models, we demonstrated the occurrence of myeloid-mediated metabolic correction of ARSA-deficient neurons and glial cells in a clinically-relevant HSC GT setting.

Titolo:

Comprendere i meccanismi di correzione enzimatica tra cellule mieloidi e neurali nella terapia genica con cellule staminali ematopoietica per il trattamento della Leucodistrofia Metacromatica

Abstract:

La leucodistrofia metacromatica (MLD) è una malattia autosomica recessiva causata da difetti nell'arilsulfatasi A (ARSA), un enzima lisosomiale che degrada i sulfatidi. Le manifestazioni neurologiche coinvolgono la sostanza bianca nel sistema nervoso centrale e periferico (CNS, PNS) e si manifestano come neuroinfiammazione e neurodegenerazione. La terapia genica con cellule staminali ematopoietiche (HSC GT) utilizza HSC autologhe ingegnerizzate con vettori lentivirali (LV) per esprimere livelli sovralfisiologici di ARSA. Questa terapia offre un beneficio clinico superiore ai pazienti affetti da MLD rispetto al trapianto allogenico convenzionale di HSC (HSCT). Sebbene sia riconosciuto il ruolo chiave della progenie mieloidi delle HSC ingegnerizzate nel fornire immunomodulazione e neuroprotezione, non è stato ancora completamente caratterizzato il meccanismo di correzione enzimatica delle cellule neurali MLD mediato dalle cellule mieloidi.

In questo progetto abbiamo dimostrato che l'enzima rilasciato dai macrofagi MLD, ingegnerizzati per esprimere livelli sovralfisiologici di ARSA, corregge metabolicamente neuroni e cellule gliali derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (hiPSC) di pazienti MLD. La sovraespressione di ARSA non influenza la vitalità ed il differenziamento delle cellule ingegnerizzate. Inoltre, la polarizzazione dei macrofagi verso uno stato pro- o anti-infiammatorio non modifica la produzione e la secrezione di ARSA e la capacità dell'enzima di indurre correzione metabolica delle cellule neurali. Abbiamo infine individuato i meccanismi molecolari che regolano la correzione enzimatica delle cellule MLD dimostrando che essa dipende, almeno in parte, dal recettore del mannosio-6-fosfato espresso nelle cellule neurali.

Utilizzando modelli cellulari umani di malattia abbiamo caratterizzato il meccanismo di correzione enzimatica di neuroni e cellule gliali mediata da cellule mieloidi in un contesto clinicamente rilevante di HSC GT.

Disease Name:

Metachromatic Leukodystrophy

Nome malattia:

Leucodistrofia metacromatica

Project number:

TGT22C10

100. DEVELOPMENTAL LACK OF TREM2 CAUSES DEFECTIVE SYNAPSE STRENGTHENING IN YOUNG ADULT MICE

Morini R.*^[1], Bizzotto M.^[2], Hernandez Soto R.^[2], Tagliatti E.^[2], Filipello F.^[2], Matteoli M.^[2]

^[1]IRCCS Humanitas Research Hospital, Rozzano, Italy ~ Rozzano ~ Italy, ^[2]Humanitas University ~ Rozzano ~ Italy

Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2) is an innate immune receptor expressed by microglia in the brain. TREM2 is central in shaping microglia profile, through the control of cell survival, phagocytosis, cytokine production and metabolism. Our group has demonstrated that, during the early stages of brain development, TREM2 is essential for microglia-mediated supernumerary synapse elimination, a key process for functional brain maturation. Consistently, mice lacking TREM2 receptor show impaired synapse elimination by microglia at postnatal day (P) 20. We have also found that phosphatidylserine exposure at synaptic sites represents a neuronal 'eat-me' signal involved in the microglial-mediated, TREM2-dependent synaptic pruning. In line with the receptor role in synapse elimination, P20 Trem2 KO mice displayed significantly higher synapse density and increased miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) frequency, which were specifically detectable in the CA1, but not CA3, region of the hippocampus. Surprisingly, young adult Trem2 KO mice analyzed at P90 exhibited a lower number of synaptic puncta in the hippocampal CA1 region, again with no changes in the CA3 area, thus indicating that the excessive synapses in Trem2 KO CA1 region during development is followed by synapse impoverishment in young adults. The defective synapse density in P90 Trem2 KO mice did not arise from excessive neuronal death, it was not the consequence of defective transcription of genes for synaptic vesicle proteins neither resulted from excessive microglia-mediated synapse elimination. Interestingly, we found a significantly higher number of immature, filopodia-like spines, in the CA1 region of P90 Trem2 KO mice. These data suggest that a compromised elimination of excessive synapses at the correct developmental time prevents their normal strengthening during circuit maturation. Understanding the molecular processes at the basis of this phenomenon might shed light into pathological conditions characterized by the lack of Trem2, such as Nasu-Hakola Disease, a genetic disorder characterized by progressive presenile dementia.

TREM2 è un recettore immunitario espresso dalla microglia nel cervello. la presenza di TREM2 nella microglia è fondamentale nel controllo della sopravvivenza cellulare, la fagocitosi, la produzione di fattori infiammatori e il metabolismo. Il nostro gruppo ha dimostrato che, durante le prime fasi dello sviluppo cerebrale, TREM2 è essenziale per l'eliminazione delle sinapsi soprannumerarie, un processo chiave per la corretta maturazione del cervello. Infatti, i topi privi del recettore TREM2 analizzati al giorno postnatale (P)20, mostrano una maggior quantità di sinapsi specificamente nella regione CA1, ma non nella regione CA3, dell'ippocampo. Sorprendentemente, a tempi di sviluppo più avanzati (P90, giovani adulti) i topi privi di Trem2 mostrano un numero di sinapsi significativamente inferiore nella regione CA1 dell'ippocampo, ancora una volta senza cambiamenti nell'area CA3. La riduzione della densità sinaptica nei topi P90 privi di Trem2 non deriva da morte neuronale, non è la conseguenza di una ridotta produzione delle proteine della sinapsi né il risultato di un'eccessiva eliminazione della sinapsi mediata dalla microglia. Tuttavia, i topi P90 privi di Trem2 mostrano, nella regione CA1, sinapsi immature, simili a filopodi. Questi dati suggeriscono che una scorretta eliminazione delle sinapsi in eccesso durante lo sviluppo, ne impedisce il normale rafforzamento durante la maturazione del cervello. La comprensione dei processi molecolari alla base di questo fenomeno potrebbe far luce su condizioni patologiche caratterizzate dalla mancanza di Trem2, come la malattia di Nasu-Hakola, una malattia genetica caratterizzata da demenza presenile progressiva.

Disease Name:

Nasu-Hakola Disease

Nome malattia:

Malattia di Nasu-Hakola

Project number:

GGP20030

101. INSIGHT CLN5: APPROACHING THERAPIES IN THE NEURONAL CEROID LIPOFUSCINOSIS, USING ZEBRAFISH AS A TOOL

Bernardi S.*^[1], Licitra R.^[1], Asahi O.^[1], Mero S.^[1], Galatolo D.^[1], Naef V.^[1], Gemignani F.^[2], Ratto G.M.^[3], Nardi G.^[3], Rapposelli S.^[4], Zang J.^[5], Neuhauss S.^[5], Marchese M.^[1]

^[1]Molecular Medicine and Neurobiology, IRCCS Fondazione Stella Maris ~ Pisa ~ Italy, ^[2]Department of Biology, University of Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[3]NEST, Istituto Nanoscienze CNR and Scuola Normale Superiore ~ Pisa ~ Italy, ^[4]Department of Pharmacy, University of Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[5]University of Zurich, Department of Molecular Life Sciences ~ Zurich ~ Switzerland

The CLN5 disease is a late-infantile form of neuronal ceroid lipofuscinosis (NCLs), a group of life-threatening lysosomal storage conditions characterized by impaired intracellular degradation pathways and clinically presenting with myoclonic epilepsy, blindness, and progressive neurodegeneration. The pathophysiology of CLN5 is only partially understood (1) and this limits the access to therapies. Zebrafish (*Danio rerio*) is a suitable model to investigate a range of metabolic, neurological, and behavioral defects in clinical conditions associated with lysosomal storage, neurodegeneration, and epilepsy, such as the NCLs (2). It is also suited for large scale drug screening. In vivo models of CLN5 will offer a valuable tool to allow the mechanistic analysis of neuronal circuits in NCLs, and to establish more targeted and effective treatments.

To improve our understanding of sick and healthy CLN5 protein during neurodevelopment, we gene-edited a new knock-out (KO) model in zebrafish. The *cln5*^{-/-} KO mutants recapitulate most of the pathophysiological features of NCL, including impaired neuronal excitability and locomotor defects at different neurodevelopmental stages. Furthermore, accumulation of SCMAS (subunit c of mitochondrial ATP synthase), increased apoptosis in the brain, deficit of mitochondrial function, and dysregulated autophagic flux were observed in our mutants compared to wild-type controls.

Preliminary analyses of the retinal function using electroretinogram (ERG) recordings showed a decreased retinal response in *cln5*^{-/-} larvae compared to WT siblings when the intensity of light increases. We can assume that the impaired retinal response of the KO mutants may be caused by the engulfment of neuronal cells, which is caused by dysregulated autophagy and lysosomal function.

Large-scale drug screening in KO larvae has just begun using commercially available FDA-approved libraries and newly synthesized, patent-pending molecules modulating autophagy pathway in CLN5 disease (3). Overall, our data offer a new tool to prepare future pharmacological trials to fight NCLs.

Approfondimento su CLN5: Approccio alle terapie nelle ceroidolipofuscinosi neuronali, utilizzando il pesce zebra come strumento.

La malattia CLN5 è una forma tardo-infantile di ceroidolipofuscinosi neuronale (NCL), un gruppo di malattie caratterizzate da un'alterazione delle vie di degradazione intracellulare potenzialmente letali, e che si presentano clinicamente con epilessia mioclonica, cecità e neurodegenerazione progressiva. La fisiopatologia della CLN5 è solo parzialmente compresa (1) e questo limita l'accesso alle terapie. Il pesce zebra (*Danio rerio*) è un modello adatto per studiare una serie di difetti metabolici, neurologici e comportamentali in condizioni cliniche associate all'accumulo lisosomiale, alla neurodegenerazione e all'epilessia, come le NCL (2). È anche adatto per lo

screening di farmaci su larga scala. I modelli in vivo di CLN5 offriranno uno strumento prezioso per consentire l'analisi meccanicistica dei circuiti neuronali nelle NCL e per stabilire trattamenti più mirati ed efficaci.

Per migliorare la nostra comprensione della proteina CLN5 malata e sana durante il neurosviluppo, abbiamo modificato geneticamente un nuovo modello knock-out (KO) nello zebrafish. I mutanti *cln5*^{-/-} KO ricapitolano la maggior parte delle caratteristiche fisiopatologiche della NCL, tra cui una compromessa eccitabilità neuronale e difetti locomotori in diverse fasi del neurosviluppo. Inoltre, nei nostri mutanti è stato osservato un accumulo di SCMAS (subunità c dell'ATP sintasi mitocondriale), un aumento dell'apoptosi nel cervello, un deficit della funzione mitocondriale e un flusso autofagico alterato rispetto ai controlli wild-type.

Analisi preliminari della funzione retinica mediante registrazioni dell'elettroretinogramma (ERG) hanno mostrato una risposta retinica ridotta nelle larve *cln5*^{-/-} rispetto ai controlli WT, quando l'intensità della luce aumenta. Possiamo ipotizzare che la ridotta risposta retinica dei mutanti KO possa essere causata dall'accumulo di sostanze di scarto nelle cellule neuronali, causata da un'alterazione dell'autofagia e della funzione lisosomiale.

Lo screening di farmaci su larga scala nelle larve KO è appena iniziato, utilizzando librerie approvate dalla FDA disponibili in commercio e molecole di nuova sintesi, in attesa di brevetto, che modulano la via dell'autofagia nella malattia *cln5* (3). Nel complesso, i nostri dati offrono un nuovo strumento per preparare futuri studi farmacologici per combattere le NCL.

Disease Name:

Neuronal ceroid lipofuscinosis 5

Nome malattia:

Ceroidlipofuscinosi Neuronale 5

Project number:

GGP20011

102. NPC INTRACELLULAR CHOLESTEROL TRANSPORTER 1 MEDIATES SARS-COV2 INFECTION

La Rosa P.^[1], Tiberi J.^[1], Palermo E.^[2], Hiscott J.^[2], Fiorenza M.T.^[1]

^[1]Division of Neuroscience, Dept. of Psychology, University La Sapienza ~ Roma ~ Italy, ^[2]Istituto Pasteur Italia-Cenci Bolognetti Foundation ~ Roma ~ Italy

The NPC1 gene encodes for an intracellular cholesterol transporter located in the endosomal/lysosomal membrane, which is involved in the mobilization of endocytosed cholesterol to the cytoplasm. Mutations of the NPC1 gene lead to massive accumulation of cholesterol and sphingolipids in lysosomes, causing a severe and invariably fatal disorder, called Niemann-Pick type C1 disease.

Cellular alterations associated to the loss of function of the NPC1 protein affect the integrity of lipid enriched plasma membrane microdomains (lipid rafts) and the endocytic pathway, which play a paramount role in viral recognition and entry within the cell. Therefore, altering NPC1 activity or expression is supposed to generate an intrinsic unfavorable host environment for SARS-Cov2, the coronavirus responsible for the recent COVID-19 pandemic. This is because the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and type 2 serine transmembrane protease (TMPRSS2) localize in lipid rafts and, by mediating the recognition and priming of the envelope's Spike (S) protein, are crucial for the entry of SARS-Cov2 into the host cells. Thereafter, the activation of clathrin/caveolae-dependent endocytic pathway allows viral nucleocapsid cleavage and genome RNA release in the cytoplasm, where replication occurs.

To investigate this issue, we used S-expressing pseudotyped lentiviral particles to transduce three different cell lines that are susceptible to SARS-Cov2 infection, following NPC1 activity inhibition or NPC1 expression abrogation by CRISPR-Cas9 editing. Our results indicate that viral infection is reduced by 50% in cells treated with the NPC1 inhibitor U18666A and completely abolished in NPC1 knockout (KO) cells. Notably, by mixing cells that express wild-type (wt) NPC1 with NPC1 KO cells we demonstrated that viral entry is dependent on the activity of the cholesterol transporter NPC1, as indicated by S expression, detected by immunofluorescence, limitedly to cells expressing wt NPC1.

Notably, although interfering with NPC1 activity or expression did not alter the expression levels of TMPRSS2 and ACE2, it determines the localization of ACE2 to the intracellular vesicular compartment reducing its content at the plasma membrane. In particular, while in NPC1 wt cells ACE2 shares its localization between plasma membrane and endosomal vesicles, in cells wherein NPC1 is inactive or ablated, ACE2 is engulfed in LC3B-positive autophagosomes. This finding provides a mechanistic underpinning for the observed cell resistance to infection.

La proteina NPC1 media l'infezione da SARS-Cov-2

Il gene NPC1 codifica per una proteina coinvolta nel trasferimento del colesterolo endocitato dal lisosoma al citoplasma. Mutazioni nella sequenza di tale gene causano l'accumulo di colesterolo e sfingolipidi all'interno del lisosoma, tipico di una grave malattia genetica rara, nota come malattia di Niemann Pick di tipo C.

SARS-Cov2 e altri virus sfruttano i macchinari e meccanismi della cellula ospite per produrre nuove particelle virali che, una volta rilasciate, perpetrano l'infezione ad altre cellule. Il danno cellulare associato alla perdita di funzione di NPC1 include alterazioni dell'integrità di specifici microdomini della membrana plasmatica particolarmente ricchi in colesterolo, le cosiddette "zattere lipidiche", che svolgono un ruolo fondamentale nel riconoscimento e nell'ingresso di molti virus all'interno della cellula. Per tale motivo, noi abbiamo ipotizzato che l'alterazione dell'attività o dell'espressione di NPC1 generasse un ambiente ospite intrinsecamente sfavorevole per il SARS-Cov2, il coronavirus responsabile della recente pandemia COVID-19. Questo proprio perchè l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) e la proteasi transmembrana TMPRSS2 si localizzano nelle zattere lipidiche e, mediando il riconoscimento e l'attivazione della proteina Spike (S) del virus, sono cruciali per l'ingresso di SARS-Cov2 nelle cellule ospiti.

Per dimostrare la nostra ipotesi, abbiamo effettuato l'inattivazione funzionale della proteina NPC1 con un farmaco specifico o ne abbiamo abolito l'espressione mediante editing genetico in tre diversi tipi di cellule, nelle quali abbiamo quindi analizzato la risposta all'infezione da SARS-Cov2. I nostri risultati indicano che l'infezione virale è ridotta del 50% nelle cellule trattate con l'inibitore di NPC1 U18666A e completamente abolita nelle cellule NPC1 knockout (KO). Inoltre, mescolando cellule in grado di esprimere una proteina NPC1 funzionale e cellule NPC1 KO, abbiamo dimostrato che l'ingresso del virus dipende strettamente dall'attività di NPC1. Infatti, esperimenti di immunofluorescenza hanno confermato l'espressione di S esclusivamente nelle cellule che esprimono NPC1 wt.

Abbiamo anche caratterizzato i meccanismi responsabili di tale effetto, dimostrando una ridotta espressione delle due proteine, ACE2 e TMPRSS2, nelle porzioni della membrana plasmatica ricche di lipidi dove esse sono normalmente localizzate e dove svolgono un ruolo cruciale nel riconoscimento e l'ingresso del virus nelle nostre cellule.

Disease Name:

Niemann Pick type C1; COVID-19

Nome malattia:

Malattia di Niemann-Pick, tipo C1

Project number:

GSP20006_Covid050

103. IPS-DERIVED IRON-BURDEN ASTROCYTE AS MODELS TO APPROACH THE THERAPY FOR PKAN AND COPAN.

Ripamonti M.^[1], Santambrogio P.^[2], Cozzi A.^[2], Rubio A.^[4], Di Meo I.^[3], Tiranti V.^[3], Levi S.*^[1]

^[1]Vita Salute San Raffaele University ~ Milano ~ Italy, ^[2]San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy, ^[3]Fondazione IRCCS-Istituto neurologico C. Besta ~ Milano ~ Italy, ^[4]Institute of Neuroscience CNR ~ Milano ~ Italy

PANK2 and COASY-associated neurodegeneration (PKAN and CoPAN) are caused by mutations in genes that codify for key enzymes on Coenzyme A (CoA) biosynthetic chain reactions (first and last two steps respectively). Both diseases are characterized by progressive neurodegeneration and excessive iron deposition in the brain. The hallmark of these diseases is the huge accumulation of iron in the globus pallidus brain region of patients. So far, it is still unknown how this alteration can cause the accumulation of iron in the brain. We used previously obtained hiPS-clones to generate either inhibitory neurons (PKAN) or a pure population of astrocytes (PKAN and CoPAN). We obtained PKAN striatal-like medium spiny neurons composed by GABAergic neurons and glial cells. Within this mixed population we detected iron deposition in both PKAN cell types, however the viability of PKAN GABAergic neurons resulted strongly affected. CoA treatment was able to reduce cell death and iron overload. A pure population of astrocytes showed a particularly evident iron accumulation, with about 50% of cells positive to Perls stain. These PKAN astrocytes indicated an alteration of iron metabolism, mitochondria morphology, respiratory activity, oxidative status, signs of ferroptosis and were prone to develop a stellate phenotype, thus gaining a neurotoxic feature. This feature was confirmed in astrocytes and glutamatergic neurons co-cultures, in which PKAN glutamatergic neurons resulted less viable in the presence of PKAN astrocytes. Analysis of constitutive exo-endocytosis, a key route for cellular iron intake, and vesicular dynamics, by exploiting the activity-enriching biosensor SynaptoZip, led to the finding of a general impairment in the constitutive endosomal trafficking in PKAN astrocytes. CoA and 4-phenylbutyric acid treatments were found to be effective in partially rescuing the aberrant vesicular behavior and iron intake. Experiments ran in CoPAN astrocytes showed iron overload (detected with Perls staining), a tendency to stellation and a positive significant correlation between the stellation grade and the amount of up taken transferrin. These preliminary results suggest a potential impairment in membrane dynamics that could be at the basis of iron overload also in CoPAN astrocytes. Thus, this astrocyte model results helpful not only to clarify pathogenetic mechanisms that lead to iron overload, but also to find common routes in two exemplar NBIA disorders. They could allow to test new therapeutic options, as for example the PPAR Gamma Agonist Leriglitzone that we found to be efficient in ameliorating mitochondrial function in PKAN astrocytes.

GLI ASTROCITI DI PKAN E COPAN MOSTRANO UN SOVRACCARICO DI FERRO E RISULTANO UTILI COME MODELLI PER TESTARE COMPOSTI TERAPEUTICI.

PKAN e CoPAN sono causate rispettivamente da difetti in PANK2 e COASY, geni che codificano per gli enzimi chiave della catena biosintetica del Coenzima A (CoA). Entrambe le malattie sono caratterizzate da neurodegenerazione progressiva e l'enorme accumulo di ferro nella regione cerebrale del globus pallidus dei pazienti. Finora non si sa ancora come questa alterazione possa causare l'accumulo di ferro nel cervello. Abbiamo utilizzato cloni di cellule staminali pluripotenti, ottenuti in precedenza dai fibroblasti dei pazienti, per generare neuroni inibitori (PKAN) o una popolazione pura di astrociti (PKAN e CoPAN). Abbiamo ottenuto una popolazione di neuroni essenzialmente composta da neuroni GABAergici e cellule gliali, che mostrava l'accumulo di ferro in entrambi i tipi di cellule PKAN. Tuttavia la vitalità dei neuroni PKAN GABAergici è risultata

fortemente ridotta. Il trattamento con CoA è stato in grado di ridurre la morte cellulare e il sovraccarico di ferro. Successivi esperimenti condotti su una popolazione pura di astrociti hanno mostrato un accumulo di ferro particolarmente evidente, con circa il 50% di cellule positive alla colorazione specifica per il ferro accumulato. Questi astrociti di PKAN presentavano un'alterazione del metabolismo del ferro, della morfologia dei mitocondri, dell'attività respiratoria, dello stato ossidativo e segni di ferroptosi. Inoltre, gli astrociti di PKAN sviluppavano un fenotipo reattivo, come una tendenza ad assumere morfologia stellata, acquisendo così una caratteristica neurotossica. Questa caratteristica è stata confermata in co-culture di astrociti e neuroni glutammatergici, in cui i neuroni PKAN sono risultati meno vitali in presenza di astrociti PKAN. Sono state condotte ulteriori analisi del traffico vescicolare costitutivo, una via chiave per l'assunzione del ferro cellulare. Questi esperimenti hanno sfruttato il biosensore SynaptoZip, il quale permette la marcatura delle vescicole attive e di seguire il loro destino. I risultati hanno dimostrato una compromissione generale del traffico endosomiale negli astrociti PKAN. I trattamenti con CoA, acido 4-fenilbutirrico si sono rivelati efficaci nel migliorare il comportamento vescicolare e l'incorporazione cellulare del ferro. Gli astrociti CoPAN hanno mostrato un sovraccarico di ferro e una tendenza ad assumere una morfologia stellata che correla con il ferro incorporato. Questi risultati preliminari suggeriscono una potenziale compromissione delle dinamiche di membrana. Questi modelli di astrociti risultano utili non solo per chiarire i meccanismi patogenetici che portano al sovraccarico di ferro, ma anche per trovare percorsi comuni in due esempi di NBIA, che potrebbero consentire di testare nuove opzioni terapeutiche, come ad esempio il Leriglitzone che abbiamo visto essere efficace nel migliorare il fenotipo PKAN.

Disease Name:

PKAN and CoPAN

Nome malattia:

Neurodegenerazione associate a difetti di PKAN e CoPAN

Project number:

GGP20047

Genetic neurological disorder\Polyneuropathies

104. MECHANISMS OF AXONAL DEGENERATION IN LATE ONSET CMT1B NEUROPATHIES: MOLECULAR PATHWAYS AND THERAPEUTIC APPROACHES

Claessens A.^[1], Shackelford G.^[1], De Blasis R.^[1], Ferri C.^[1], Baldi R.^[1], Valenzano S.^[2], Del Carro U.^[2], Crivellari L.^[3], Pisciotta C.^[3], Saveri P.^[3], Feltri L.^[4], Wrabetz L.^[4], Pareyson D.^[3], D'Antonio M.*^[1]

^[1]Università Vita Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[2]IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[3]Istituto Neurologico C. Besta ~ Milan ~ Italy, ^[4]University at Buffalo ~ Buffalo ~ United States of America

Background: Charcot-Marie-Tooth (CMT) neuropathy is one of the most common neurodegenerative diseases of the PNS. CMT involves both axonal (CMT2) and demyelinating (CMT1) forms but ultimate progression of neuropathy reflects axonal degeneration in either type. CMT1B, the second most common CMT1, is caused by mutations in the Myelin Protein Zero (MPZ) gene. Most patients with CMT1B present with one of two distinct phenotypes: one with extremely slow nerve conduction velocities and onset in the period of motor development. Surprisingly, since MPZ is only expressed by Schwann cells, the second major group presents as an axonal neuropathy, with onset of symptoms as adults, and therefore is classified as CMT2J/I. The glial mechanisms contributing to axon protection are considered the key to understand and cure neuropathies but remain largely uncharacterized. In CMT2J/I axonal degeneration is uncoupled from demyelination, providing a unique opportunity to understand how to protect axons. Specific Aims: To dissect the glial mechanisms contributing to axon protection or degeneration in this project we pursue the following aims:

Aim1: Explore the molecular mechanisms of axonal degeneration in CMT2J/I models

Aim2: Genetically and pharmacologically modulate the axon degeneration-promoting SARM1 pathway in CMT2J mice.

Aim3: Characterize phenotype and disease course in CMT2J/I patients

Results: We generated two authentic models of CMT2J (Mpz-T124M) and CMT2I (Mpz-P70S). Both mice recapitulate the axonopathy observed in humans. In particular, T124M mice show axonal loss with only minor defects in compact myelin, metabolic changes that could lead to axonal degeneration, and prominent alterations in non-compact myelin domains. One of the most promising “druggable” target to counteract axonal degeneration is the NADase SARM1. To explore the contribution of SARM1 to CMT2J, we generated Mpz-T124M/SARM1 null mice. Unfortunately, SARM1 deletion did not fully rescue the neuropathy of 12-month-old T124M mice. Nerve conduction velocity and compound motor action potential are lowered in T124M mice but remain unaltered in the double mutants. At earlier time points we could not observe a delayed disease onset or slowed progression either. However, we detected a reduction in the concentration of NF-L and, through crossbreeding these mice with a Thy-YFP reporter line, reduced signs of degenerating axons. Overall, our data suggest that SARM1 is only marginally protective in CMT2J and that further disease mechanism must be involved.

Finally, we are clinically characterizing 30 P70S-CMT2I and eight T124M-CMT2J patients; for some of them, we are conducting every year follow-up visits according to a specific protocol. We collected skin samples for immunohistochemistry studies from a total of 13 patients. Interestingly, at least in T124M samples, preliminary results suggest an involvement of non-compact myelin. Plasma samples' collection and analysis for NF-L are also ongoing.

MECCANISMI DI DEGENERAZIONE ASSONALE NELLE MALATTIE DI CHARCOT-MARIE-TOOTH DI TIPO 1B AD INSORGENZA TARDIVA: PATHWAYS MOLECOLARI E APPROCCI TERAPEUTICI

Le neuropatie di Charcot-Marie-Tooth (CMT) sono un gruppo di patologie rare del sistema nervoso

periferico che colpiscono lo sviluppo e l'integrità della mielina, la guaina isolante che avvolge i nervi. Sebbene siano stati identificati diversi geni coinvolti nelle neuropatie, come essi causino la malattia è ancora poco chiaro, e al momento non esistono terapie efficaci. Per esempio, ancora non si conoscono quali siano i meccanismi che causano la degenerazione assonale (che è alla base della disabilità in tutti i pazienti) nelle CMT. Alcune forme di CMT sono causate da mutazioni nel gene che codifica per la proteina zero della mielina (MPZ). Studi recenti suggeriscono che mutazioni in MPZ che portano a degenerazione assonale possano agire alterando le connessioni tra la mielina e l'assone. Per capire meglio queste connessioni, e per poter disegnare delle terapie efficaci, studiamo dei topi che contengono il gene MPZ mutato. Abbiamo infatti mostrato che questi topi rappresentano un eccellente modello della malattia. In questi animali abbiamo identificato un meccanismo potenzialmente tossico, e in questo progetto ci proponiamo di caratterizzarlo ulteriormente e di verificare se la sua modulazione genetica e farmacologica sia in grado di migliorare la malattia, con il fine ultimo di identificare un trattamento per le neuropatie ereditarie.

In parallelo, analizzeremo una vasta coorte di pazienti con neuropatia assonale dovuta alle stesse mutazioni dei modelli murini da un punto di clinico, seguendo specifici protocolli per essere pronti a futuri trial clinici.

Disease Name:

Charcot-Marie-Tooth neuropathy

Nome malattia:

Malattia di Charcot-Marie-Tooth

Project number:

GGP19099

105. PHARMACOLOGICAL MODULATION OF MYELIN SYNTHESIS AND CYTOSKELETAL REMODELLING AS A THERAPEUTIC STRATEGY FOR CMT4B NEUROPATHIES WITH ABERRANT MYELIN

Rebuffini P., Di Guardo R., Cipriani S., Bolino A.*

IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy

Charcot-Marie-Tooth type 4B (CMT4B) is a severe autosomal recessive demyelinating neuropathy with childhood onset characterized by redundant loops of myelin in the nerve termed myelin outfoldings, which progressively degenerate affecting nerve physiology. CMT4B comprises three distinct genetic and clinical subtypes named CMT4B1, B2, and B3. While CMT4B1 and B2 present with a classical motor and sensory neuropathy phenotype, CMT4B3-associated phenotypes range from a pure demyelinating poly-neuropathy to an axonal neuropathy plus complex central nervous system (CNS) phenotypes.

CMT4B neuropathies are caused by loss-of-function mutations in the myotubularin-related 2 (MTMR2, CMT4B1), MTMR13 (CMT4B2), and MTMR5 (CMT4B3) genes. MTMR2, MTMR5, and MTMR13 belong to a broad family of protein tyrosine phosphatase/dual specificity-like phosphatases (PTP/DSP), which consists of 14 members in mammals. Interestingly, MTMR5 and MTMR13 are catalytically inactive proteins, whereas MTMR2 is a catalytically active enzyme, which in vitro is predicted to dephosphorylate the 3-phosphoinositides PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 in the 3-position of the inositol ring. Heterodimers of MTMR2 with either MTMR5 or MTMR13 are thought to possess higher enzymatic activity and a different sub-cellular localization as compared to MTMR2 homodimers.

How MTMR2 loss and the resulting imbalance of 3'-phosphoinositides result in CMT4B1 is

unknown. Recently we showed that MTMR2 by regulating PtdIns(3,5)P2 levels coordinates mTORC1-dependent myelin synthesis and RhoA/myosin II-dependent cytoskeletal dynamics to promote myelin membrane expansion and longitudinal myelin growth. Consistent with this, pharmacological inhibition of PtdIns(3,5)P2 synthesis or mTORC1/RhoA signaling ameliorates CMT4B1 phenotypes. Our data reveal a crucial role for MTMR2-regulated lipid turnover to titrate mTORC1 and RhoA signaling and to control myelin growth.

Modulazione farmacologica della sintesi di mielina e del citoscheletro cellulare quale strategia terapeutica per la neuropatia di tipo CMT4B caratterizzata da mielina aberrante.

Le neuropatie di Charcot-Marie-Tooth (CMT) rappresentano un gruppo molto ampio di malattie ereditarie con un'incidenza di 1 su 2500 individui. Esse sono caratterizzate da debolezza e atrofia muscolare progressive con un'età di esordio generalmente compresa tra la prima e seconda decade di vita. Tra le diverse forme di CMT, CMT4B1 è una neuropatia demielinizzante molto severa con esordio nell'infanzia, caratterizzata da outfoldings di mielina, una forma degenerativa di mielinizzazione. Queste alterazioni non sono solo presenti in CMT4B1 ma anche in altre forme di CMT quali CMT4B2, B3, CMT4C e CMT4H. Il nostro gruppo ha dimostrato che la mancanza di MTMR2 (Myotubularin-related) è causa della neuropatia CMT4B1. MTMR2 è una proteina fosfatasi che agisce su un particolare tipo di fosfolipidi, i fosfoinositidi, importanti regolatori del traffico di membrana, un processo biologico fondamentale soprattutto nella cellula di Schwann che produce mielina nel sistema nervoso periferico. Negli anni, il nostro gruppo ha anche contribuito a sviluppare diversi modelli di CMT4B1 fondamentali per comprendere le basi patogenetiche di queste neuropatie.

Più recentemente, abbiamo dimostrato che MTMR2, attraverso la sua attività enzimatica, controlla la dinamica del citoscheletro cellulare e la sintesi di membrana, necessari per la crescita della mielina stessa. In questo progetto ci proponiamo di validare a livello preclinico strategie terapeutiche basate sull'uso di alcuni composti, già utilizzati sull'uomo, che mirano a ripristinare questi meccanismi alterati nelle cellule di Schwann CMT4B1. Useremo sia modelli della neuropatia di CMT4B1 che di CMT4B2.

Disease Name:

Charcot-Marie-Tooth neuropathy

Nome malattia:

Malattia di Charcot-Marie-Tooth

Project number:

GGP20063

106. BOOSTING HSPB3 TO PREVENT NEUROMUSCULAR DEGENERATION IN PERIPHERAL NEUROPATHIES

Carra S.*

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia ~ Modena ~ Italy

Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2) is an inherited peripheral neuropathy whose genetic mutations lead to axonal degeneration of motor neurons and progressive muscle weakness. The neuromuscular junction (NMJ), which is the site for the transmission of signals from the motor neuron to the muscle cell, is emerging as an important site of pathology in peripheral neuropathies. Repeated round of denervation and reinnervation have been reported during disease and failure to

regenerate functional NMJs seems to play a prominent role in disease progression. Thus, approaches aimed at boosting NMJ regeneration hold promise for the treatment of peripheral neuropathies. This process relies on the ability of the neuromuscular system to promote the differentiation of skeletal muscle cells (SkMCs) and motor neurons (MNs) during adulthood.

This project focuses on the small heat shock protein HSPB3, which is upregulated in SkMCs during differentiation. HSPB3 is also found in MNs, but its physiological functions in SkMCs and MNs are largely uncharacterized. Four mutations in the HSPB3 gene were reported in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2) and congenital myopathy with neuropathy signs, suggesting that HSPB3 plays important functions for SkMC and MN viability.

This proposal builds on extensive data revealing an unprecedented role for HSPB3 as specialized chaperone required for SkMC differentiation. Here, we aim at demonstrating if HSPB3 also promotes the differentiation of MNs, pinpointing the molecular processes that are activated by HSPB3 and deregulated by its rare variants. We hypothesize that HSPB3 dysfunction contributes to MN and muscle degeneration by impairing the regenerative capacity of the neuromuscular system. Using human induced pluripotent stem cell-derived SkMCs and MNs, we will pinpoint molecular processes that are deregulated upon HSPB3 loss or mutation, identifying HSPB3-linked pathomechanisms.

Finally, we aim at identifying FDA-approved compounds that boost differentiation and axonal regeneration by upregulating HSPB3.

Potenziare l'espressione di HSPB3 per prevenire la degenerazione neuromuscolare nelle neuropatie periferiche

Disease Name:

Charcot-Marie-Tooth type 2; Distal hereditary motor neuropathy type 2

Nome malattia:

Malattia di Charcot-Marie-Tooth, tipo 2; Neuropatia motoria ereditaria distale, tipo 2

Project number:

GMR22T1003

107. KNOCKDOWN AND REPLACEMENT OF MFN2: A GENE THERAPY TO TREAT DOMINANTLY INHERITED PERIPHERAL NEUROPATHY CMT2A

Rizzo F.^[1], Abati E.^[1], Bono S.^[2], Ruepp M.D.^[3], Salani S.^[2], Ottoboni L.^[1], Melzi V.^[2], Cordiglieri C.^[4], Pagliarani S.^[2], De Gioia R.^[2], Anastasia A.^[2], Taiana M.^[1], Garbellini M.^[2], Lodato S.^[5], Kunderfranco P.^[5], Cazzato D.^[6], Cartelli D.^[6], Lonati C.^[2], Bresolin N.^[1], Comi G.^[1], Nizzardo M.^[2], **Corti S.*^[1]**

^[1]University of Milan ~ Milan ~ Italy, ^[2]Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milan ~ Italy, ^[3]King's College London ~ London ~ United Kingdom, ^[4]Istituto di Genetica Molecolare "Romeo ed Enrica Invernizzi" ~ Milan ~ Italy, ^[5]IRCCS Humanitas Research Hospital ~ Milan ~ Italy, ^[6]Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta. ~ Milan ~ Italy

Charcot-Marie-Tooth type 2A (CMT2A) is an inherited sensory-motor axonopathy caused by autosomal dominant missense mutations in the mitofusin2 (MFN2) gene (Zuchner et al., 2004; Stuppia et al., 2015; El-Hattab et al., 2018). Although no effective treatment exists, gene therapy is a potential curative therapeutic strategy tailored to correcting the root genetic defect. In contrast to recessively inherited diseases, treating autosomal dominant disorders such as CMT2A implies silencing the dominant allele without altering the expression of the wt gene. RNA interfering (RNAi) mediated by small RNAs, including shRNA, is a powerful gene knockdown technique that permits controlled suppression of a mutant gene (Bobbin et al., 2016). However, although shRNA could theoretically discriminate single nucleotide alterations, designing such specific shRNA is very

challenging and would require the production and validation of a different construct for each human mutation. Here, we propose a novel therapeutic strategy: though mutant and wild-type MFN2 mRNA are inhibited by RNA interference (RNAi), the wild-type protein is restored by overexpressing cDNA encoding functional MFN2 modified to be resistant to RNAi. We tested this strategy in CMT2A patient-specific human induced pluripotent stem cell (iPSC)-differentiated motor neurons (MNs), demonstrating the silencing of endogenous MFN2 and replacement with an exogenous copy of the functional wild-type gene. This approach significantly rescues the CMT2A MN phenotype in vitro, stabilizing the altered axonal mitochondrial distribution and correcting abnormal mitophagic processes. This strategy also allows proper MFN2 molecular correction in vivo in the CMT2A transgenic mouse model after cerebrospinal fluid (CSF) delivery of the constructs into CMT2A mice using adeno-associated virus 9 (AAV9). Our approach could be the first effective treatment for CMT2A and will have a broad translational impact on other genetic neuromuscular disorders.

La malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una neuropatia sensitivo-motoria, caratterizzata dalla morte dei neuroni motori e sensitivi, che risulta in una progressiva debolezza agli arti, atrofia muscolare e perdita della sensibilità. E' causata da mutazioni nel gene Mitofusina2 (MFN2) che codifica per la proteina MFN2 localizzata nella membrana di un organello cellulare, il mitocondrio, che rappresenta la centrale energetica delle cellule. Ad oggi, purtroppo, non è ancora disponibile nessuna terapia risolutiva e pochissimi sono i gruppi di ricerca che si occupano di studiare questa malattia. La terapia genica rappresenta una promettente strategia in quanto finalizzata a correggere la causa genetica alla base della malattia stessa. Nel caso di questa patologia, non solo la mancanza del gene "sano", ma anche la presenza della proteina MFN2 "malata" sono la causa della patologia. In questo studio, abbiamo sviluppato un possibile approccio terapeutico per questa patologia basato appunto sullo "spegnimento del gene MFN2 malato" in combinazione con "la somministrazione del gene MFN2 normale" nel modello cellulare e animale della malattia. Il nostro approccio potrebbe rappresentare il primo trattamento efficace per questa malattia e avere un ampio impatto traslazionale su altre polineuropatie a componente genetica.

Disease Name:

Charcot-Marie-Tooth type 2°

Nome malattia:

Malattia di Charcot-Marie-Tooth, tipo 2°

Project number:

GGP19002

Genetic neurological disorder\Prion diseases

108. PHARMACOLOGICAL DEGRADERS FOR THE CELLULAR PRION PROTEIN

Innocenti N.*, Biasini E.

Department CIBIO University of Trento ~ Trento ~ Italy

We have recently developed an approach for selectively reducing the level of target proteins by impairing their folding process rather than targeting their native conformations.¹ The method, called Pharmacological Protein Inactivation by Folding Intermediate Targeting (PPI-FIT), is made possible by computational algorithms allowing the full atomistic reconstruction of protein folding pathways. Such unique information could be exploited by identifying metastable structural conformers of a protein, distinct from the native state, appearing along the folding process (i.e., folding intermediates). PPI-FIT's rationale is that targeting a folding intermediate with small ligands could promote its removal by the cellular quality control machinery, which recognizes such artificially stabilized intermediates as improperly folded species. We have applied PPI-FIT to target the cellular prion protein (PrP), a key player in prion diseases, and identified a pharmacological degrader (called SM875) capable of dose-dependently suppressing the expression of the protein.^{2,3}

In the project's first year, we designed and performed a synthesis scheme for SM875. The correct structure of the molecule was verified by nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (MS), and infrared (IR) spectroscopy. Such a scheme allowed us to introduce modifications into the chemical scaffold, leading to tens of different analogs. Each molecule was tested in vitro to assess the ability to suppress PrP expression. We tested 44 synthetic analogs differing from the parent compound for one or more chemical substitutions. Dose-dependent analysis of each molecule by imaging-based cellular assay explicitly designed to test SM875 derivatives allowed us to draw a first structure-activity relationship model employed to refine the docking pose of compound-pocket interaction. These results represent fundamental steps along the SM875 hit-to-lead optimization pipeline, which could ultimately define a version of the compound suitable for subsequent validation in animal models of prion diseases.

Sviluppo di farmaci in grado di promuovere la degradazione cellulare della proteina prionica.

Le malattie da prioni sono rare patologie neurodegenerative che colpiscono l'uomo e altri mammiferi. Questi disordini possono essere trasmessi per via genetica o infettiva, e sono stati responsabili dell'epidemia di encefalopatia spongiforme bovina, nota come malattia della mucca pazza, che colpì principalmente l'Europa alla fine degli anni '90. Le malattie da prioni sono causate dalla conversione di una normale proteina espressa principalmente sulla superficie delle cellule nervose, chiamata PrP, in una forma aberrante, chiamata PrP^{Sc}. Una volta formata, PrP^{Sc} si comporta come un agente infettivo (prione), in grado di propagarsi inducendo la conversione di altre molecole di PrP, accumulandosi in grandi ammassi e danneggiando il cervello. Sebbene non siano attualmente disponibili cure per queste patologie, dati recenti hanno suggerito che ridurre l'espressione della forma normale della proteina PrP potrebbe rappresentare una valida strategia terapeutica. Il nostro gruppo ha sviluppato una nuova tecnologia, denominata PPI-FIT, per identificare farmaci in grado di ridurre selettivamente i livelli di proteine bersaglio. Grazie a questa tecnologia abbiamo identificato una molecola capace di diminuire i livelli di PrP e bloccare la replicazione di PrP^{Sc} nelle cellule. Tuttavia, questo composto deve essere ulteriormente sviluppato prima di essere somministrabile in sicurezza a pazienti. Il progetto intende perseguire proprio questo obiettivo. I risultati potrebbero fornire una preziosa risorsa farmacologica per il trattamento delle malattie da prioni, nonché di patologie del sistema nervoso molto più diffuse,

come la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson, per le quali è stato recentemente identificato un ruolo dannoso per la proteina PrP.

Disease Name:

Prion Diseases

Nome malattia:

Malattie da Prioni

Project number:

GGP20043

Genetic bone disease

109. PHENOTYPE OF THE FIRST MOUSE MODEL OF COLE CARPENTER SYNDROME.

Patrizii P.^[1], Desmond K.^[1], Newman O.^[1], Pucci E.^[1], Stoppacciaro A.^[2], Menè P.^[2], Teti A.^[1], Maurizi A.^[1]

^[1]University of L'Aquila ~ L'Aquila ~ Italy, ^[2]University Sapienza ~ Rome ~ Italy

The Cole Carpenter Syndrome (CCS) is a rare genetic disease displaying an autosomal dominant inheritance with a prevalence <1:1,000,000. It affects mainly the bone, which becomes brittle and fractures many times. Genetically, the CCS is caused by the heterozygous p.Y393C mutation in the P4HB gene encoding for the protein disulfide isomerase A1 (PDIA1). This enzyme is involved in the oxidative folding of nascent protein chains and acts as chaperone for the type 1 collagen. To date, there are no studies showing how the CCS-inducing mutation affects the skeletal and non-skeletal tissues and the disease has no cure. Based on this, we generated a mouse model carrying the aminoacidic substitution tyr393cys (CCS mouse) by constitutive knock-in strategy. Gross evaluation revealed no obvious changes in body length and weight of CCS mice. However, the bone phenotype, assessed by μ CT in 1, 3, 6 and 12 months old male and female CCS mice showed marked osteopenia compared to the WT counterpart. In addition, the Indentation Distance and the Total Indentation Distance were dramatically increased in CSS femurs compared to WT, indicating a poor bone quality. Interestingly, the metabolic analysis revealed a significant reduction of postprandial blood glucose levels in 1 and 6 month-old CCS male mice compared to WT, along with an unchanged glucose and insulin tolerance. This finding could be linked to renal defects found in CSS mice consisting of an extensive tubular vacuolization, along with intracellular protein deposits, intraluminal protein cylinders and glomerular shrinkage, which can lead to an excessive glucose leakage in the urines. At the subcellular level, Western blot analysis conducted in primary CCS mouse osteoblasts showed a significant reduction of type 1 collagen production and secretion associated with an increased pro-collagen 1 expression compared to WT. In line with this, in vivo serum PINP1 levels, a marker of type I collagen turnover in the bone matrix, were lower in CCS mice as well. Of note, BiP1 expression was higher in CCS osteoblasts suggesting the presence of ER stress probably induced by the alteration of type 1 collagen trafficking. Overall, our data indicate the presence of a severe bone phenotype in CCS mice, consistent with the skeletal features of the human disease, and the pathogenic involvement of organs beyond the bone, such as kidneys. Moreover, we demonstrated the presence of a defective type 1 collagen trafficking leading to ER stress. The next step of the project will be the completion of the characterization of the CCS disease models in vitro and in vivo and the test of an experimental therapy for treating this neglected disorder.

Titolo: Studio del fenotipo del primo modello murino di sindrome di Cole Carpenter.

La sindrome di Cole Carpenter (CCS) è una malattia genetica rara che colpisce principalmente lo scheletro rendendolo fragile. Per tale motivo i pazienti affetti da questa malattia vanno incontro a fratture multiple durante il corso della loro vita. Inoltre, essi presentano un vasto spettro di alterazioni ossee che causano varie e vaste deformità scheletriche. Tutto ciò compromette in maniera importante la vita di queste persone. Ad oggi non ci sono cure per questa patologia, quindi lo sviluppo di una terapia per i pazienti affetti da CCS rappresenta una sfida molto importante. Per questo motivo, il nostro obiettivo è di comprendere meglio i meccanismi che causano la CCS utilizzando un modello animale della malattia, sviluppato nel nostro laboratorio, al fine di sviluppare una terapia mirata. In particolare, i nostri risultati hanno mostrato come il modello animale da noi generato riproduca fedelmente la patologia umana e sia caratterizzato da una riduzione della quantità e della qualità del tessuto osseo. Questo sembra essere causato da una disfunzione nelle

cellule deputate alla produzione di tessuto osseo, denominate osteoblasti. In particolare, in queste cellule abbiamo constatato una riduzione nella produzione e secrezione della principale componente della matrice ossea, il collagene di tipo 1. In linea con questo, il turnover (o ricambio) del collagene di tipo 1 in vivo era ridotto nel modello animale di CCS rispetto al controllo sano. Tale alterazione sembra indurre negli osteoblasti l'attivazione di meccanismi di stress, ed in particolare quelli a carico del reticolo endoplasmatico. Oltre a questo, il modello animale presentava ridotti livelli di glicemia post-prandiale probabilmente causati da alterazioni a livello renale che inducevano una maggiore perdita di glucosio nelle urine. In questa prima fase di progetto, ci siamo quindi concentrati sullo studio del modello animale della sindrome di Cole-Carpenter, identificando le alterazioni patologiche. I dati ottenuti verranno utilizzati nella seconda fase per la messa a punto di una terapia sperimentale mirata per il trattamento di questa sindrome. In caso di successo questo progetto permetterà di ottenere una maggiore conoscenza della malattia e una terapia sperimentale che potrà essere sviluppata per i pazienti. Infine, il nostro approccio potrebbe essere esteso anche ad altre malattie con cause e meccanismi simili alla CCS.

Disease Name:

Cole Carpenter Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Cole Carpenter

Project number:

GGP20074

110. "SEARCHING NEW MOLECULAR TARGETS IN FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA (FOP): IS THE AUTOPHAGY SIGNALLING A GOOD CANDIDATE?"

Cocolo L.^[1], Wits M.^[2], Sessa R.L.^[1], Volpe E.^[3], Ciolfi S.^[3], Rinaldo S.^[4], Cutruzzola" F.^[4], Trisciuglio D.^[1], Sanchez--Duffhues G.^[2], Stagni V.*^[1]

^[1]Institute of Molecular Biology and Pathology, National Research Council (CNR), 00185, Rome, Italy ~ Roma ~ Italy, ^[2]Department of Cell & Chemical Biology, Leiden University Medical Center, 2333, ZC Leiden, The Netherlands. ~ Leiden ~ Netherlands, ^[3]Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Fondazione Santa Lucia, Rome ~ Roma ~ Italy, ^[4]Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, Piazzale Aldo Moro 5, 00185, Rome, Italy. ~ Roma ~ Italy

Heterotopic Ossification (HO) within soft connective tissues occurs sporadically in response to trauma, or by genetic mutation in the rare, autosomal dominant disorder, Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP; MIM 135100) [1]. FOP is caused by a recurrent heterozygous activating mutation of activin receptor A, type I/activin-like kinase 2 (ACVR1/ALK2), a bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor [2]. The canonical FOP mutation (R206H) exhibits loss of auto inhibition of BMP signalling, that results in constitutive active ACVR1 signalling and correlates with enhanced chondrogenic differentiation. Although gain-of-function ACVR1 mutations are identified as the sole genetic cause of HO in FOP, the molecular mechanism involved in the effect of the mutant ACVR1 is still under investigation. Autophagy is an essential pathway necessary to maintain cartilage homeostasis, in particular in the hypoxic environment necessary for chondrocytes growth in vivo [3,4]. Interestingly, hypoxia or Activin A stimulation might enhance BMP signalling in FOP [3,4]. Our lab is currently collaborating with Prof Sanchez-Duffhues'lab (LUMC, Leiden) on investigating molecular mechanisms involved in FOP progression. Herein, we provide, for the first time, evidence of a dysregulation of autophagy signalling in ATCD5 cells expressing mutant FOP receptor. Notably, we discovered that autophagic signalling is impaired in ATCD5 cells exogenously expressing mutant ACVR1 Receptor (ACVR1-R206H), and that this

correlates with enhancement of chondrocyte differentiation. Interestingly, we confirmed these data on cells derived from FOP patients, supporting the idea that autophagic flux is impaired in FOP cells, and that drugs that could induce autophagy could be beneficial for FOP patients. At the molecular level, we hypothesize that autophagy is necessary for degradation of receptor during differentiation in a hypoxic environment. Overall, this study could contribute to find new molecular "actors" involved in FOP progression, and so could lead to the design new molecular target therapies for FOP.

"Identificazione di nuovi bersagli molecolari per la fibrodiplosia ossificante progressiva (FOP): la via autofagica è coinvolta?"

La fibrodiplosia ossificante progressiva (FOP) è una forma ereditaria di ossificazione eterotopica (OE). La causa genetica della FOP è una mutazione eterozigote del gene ACVR1, la cui attivazione costitutiva è coinvolta in OE. Nonostante ciò, non sono ancora state investigate in modo approfondito le vie molecolari coinvolte a valle del recettore mutato. L'ambiente ipossico è fondamentale per l'ossificazione eterotopica in FOP e inoltre è responsabile del mantenimento del segnale costitutivamente attivo del recettore mutante ACVR1. In questo progetto abbiamo ipotizzato che la via di segnalazione autofagica possa essere coinvolta nel sostenere l'ossificazione eterotopica e il segnale di ACVR1 mutato in FOP, in particolare come adattamento all'ambiente ipossico. Il nostro laboratorio sta attualmente collaborando con il Prof Sanchez-Duffhues (LUMC, Leiden) al fine di identificare nuove vie di segnalazione deregolate nella FOP. In particolare i nostri dati supportano l'idea che nelle cellule FOP ci sia una deregolazione della via autofagica. Inoltre, abbiamo dimostrato che la riattivazione della via autofagica in cellule che esprimono il recettore mutante, è in grado di rallentare l'ossificazione eterotopica in vitro, suggerendo che la modulazione di questa via potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per la FOP.

Disease Name:

Fibrodiplosia Ossificans Progressiva

Nome malattia:

Fibrodiplosia Ossificante Progressiva

Project number:

GSA21A002

111. HOW LACK OF TRIMERIC INTRACELLULAR CATION CHANNEL B AFFECTS BONE

Contento B.^[1], Garibaldi N.^[1], Palladino E.^[1], Sala A.^[1], Brini M.^[2], Sonntag S.^[3], Forlino A.^[1], Besio R.^{*[1]}

^[1]University of Pavia ~ Pavia ~ Italy, ^[2]University of Padova ~ Padova ~ Italy, ^[3]University of Bonn ~ Bonn ~ Germany

Ubiquitous lack of trimeric intracellular cation channel B (TRIC-B), an ER channel specific for K⁺ ions necessary as counter ions for intracellular calcium flux, is associated to a recessive form of Osteogenesis Imperfecta (OI), a group of collagenopathies characterized by reduced bone mass and bone fragility (1). In order to address TRIC-B function in bone, an osteoblast specific conditional knock-out mouse of TRIC-B (Runx2Cre;Tmem38^{bf/fl}) was generated and its phenotyping was undertaken. The mutant skeleton showed bone deformations and frequent calli. Delay in mineralization was also evident. Importantly, mutant mice showed a significant smaller size and >80% lethality within the first 38 days, indicating the impact of the bone fracture and deformation on the severity of the disease. Micro computed tomography analysis demonstrated the

presence of an osteoporotic phenotype affecting both the cortical and the trabecular compartments. Primary calvarial osteoblasts were employed to evaluate the impact of loss of TRIC-B function on calcium flux and osteoblasts activity. A decreased calcium concentration in mitochondria, reflecting an impairment in calcium flux through the ER, was found in primary mutant osteoblasts that showed a decreased mineralization and alkaline phosphatase activity, as well as a delay in cell differentiation. Importantly, these alterations were associated to a decreased collagen synthesis and a reduced collagen incorporation into the matrix. The osteoporotic phenotype found in the Runx2Cre;Tmem38bfl/fl mouse proves the primary function of osteoblast TRIC-B for bone development.

Come l'assenza di TRIC-B causa il fenotipo scheletrico nell'Osteogenesi Imperfetta

La mancanza ubiquitaria del canale cationico intracellulare trimetrico B (TRIC-B), un canale nel reticolo endoplasmatico specifico per gli ioni K⁺ necessari come controioni per il flusso di calcio intracellulare, è associata a una forma recessiva di Osteogenesi Imperfetta (OI). OI è un gruppo di collagenopatie caratterizzate da ridotta massa ossea e fragilità ossea. Al fine di comprendere la funzione TRIC-B nell'osso, è stato generato un topo knock-out condizionale di TRIC-B specifico negli osteoblasti (Runx2Cre; Tmem38bfl/fl) ed è stata intrapresa la sua analisi fenotipica.

Lo scheletro del modello murino ha mostrato deformazioni ossee e calli frequenti. Anche il ritardo nella mineralizzazione era evidente. È importante sottolineare che i topi mutanti hanno mostrato una dimensione significativamente inferiore e una letalità superiore all'80% entro i primi 38 giorni di vita, indicando l'impatto delle fratture ossee e delle deformazioni sulla severità della malattia. L'analisi mediante micro tomografia computerizzata ha dimostrato la presenza di un fenotipo osteoporotico che interessa sia il compartimento corticale che quello trabecolare. Gli osteoblasti primari estratti dal modello sono stati impiegati per valutare l'impatto della perdita della funzione TRIC-B sul flusso di calcio e sull'attività degli osteoblasti. Una ridotta concentrazione di calcio nei mitocondri, che riflette una compromissione del flusso di calcio attraverso il reticolo endoplasmatico, è stata riscontrata negli osteoblasti mutanti primari che mostravano una ridotta mineralizzazione e attività della fosfatasi alcalina, nonché un ritardo nella differenziazione cellulare. Queste alterazioni sono state associate a una ridotta sintesi di collagene e a una ridotta incorporazione di collagene nella matrice.

Il fenotipo osteoporotico presente nel topo Runx2Cre; Tmem38bfl/fl dimostra la funzione primaria di TRIC-B negli osteoblasti per lo sviluppo osseo.

Disease Name:

Osteogenesis Imperfecta

Nome malattia:

Osteogenesi Imperfetta

Project number:

GMR22T1024

112. CHARACTERIZING THE MOLECULAR FUNCTIONS OF TENT5/FAM46 PROTEINS

Resnati M.^[2], Riva E.^[2], Materozzi M.^[2], Cenci S.^[1], Milan E.^{*[1]}

^[1]Università Vita-Salute San Raffaele ~ Milano ~ Italy, ^[2]San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy

The secretory pathway is a key determinant of cell identity, tissue specialization and organism evolution. Harnessing protein secretion offers unprecedented biotechnologic and therapeutic opportunities but is greatly limited by knowledge gaps. TENT5/FAM46 is a family of 4 poly(A)-

polymerases that selectively stabilize mRNAs encoding for Endoplasmic Reticulum (ER)-targeted proteins, boosting in this way the secretory activity (1-2). In line, FAM46 proteins cause or are associated with different diseases related to secretory cells. Mutations in FAM46A are responsible for a rare form of osteogenesis imperfecta due to impaired collagen secretion by osteoblasts, FAM46B expression is associated with refractory lupus nephritis, whereas FAM46C is frequently mutated in multiple myeloma, the cancer of antibody secreting plasma cells (3-6). However, despite a 50-70% of identity, we disclosed that FAM46 members display high variability on tissue expression, cellular localization and effects, with many aspects in the underlying mechanism still elusive and FAM46B and D roles virtually unknown (2). We hypothesize that the complete characterization of their molecular features and functions will teach us how to exploit them as natural tuner of protein secretion. Interestingly, we found that the overexpression of FAM46 proteins increases the apoptotic susceptibility in plasma cells, while is well tolerated in non-professional secretors, implying a threshold of sustainability for the secretory cargo, and indicating that an equilibrium between protein synthesis, ER import, folding and trafficking is necessary to make intensive secretion compatible with cell survival (2). In line, we disclosed that, beyond its mRNA stabilizing activity, FAM46C increases the levels of rRNA and tRNA methyltransferases promoting ribosome biogenesis and optimizing the translation of rare codons, suggesting the existence of an integrated network coordinating ER expansion with translation efficiency. Finally, our data show that FAM46 proteins are potentially able to promote secretion in all cell types, and to favor the formation in vitro of the mature forms of otherwise ER-retained mutants. For these reasons, we believe that the dissection of these molecular circuits will pave the way to novel therapeutic strategies not only against FAM46-associated diseases, but also for a broad range of inherited diseases of compromised ER transport.

La secrezione proteica è il processo attraverso il quale le proteine vengono rilasciate all'esterno dalla cellula ed ha ruoli essenziali nello sviluppo, la funzione e la sopravvivenza di cellule, tessuti e organismi. Pertanto, esso è una forza trainante nella specializzazione dei tessuti e nell'evoluzione degli organismi complessi. Tutte le cellule secernono proteine; tuttavia, alcune cellule, come le plasmacellule, specializzate nella produzione di anticorpi, sono professionalmente dedite alla secrezione. FAM46/FAM46 è una famiglia composta da 4 proteine che stabilizzano selettivamente gli mRNA codificanti proteine dirette alla via secretoria, promuovendo in questo modo la secrezione proteica. Coerentemente con questo ruolo cellulare, le proteine FAM46 sono associate a varie malattie delle cellule secretorie. Infatti, mutazioni in FAM46A sono responsabili di una rara forma di osteogenesi imperfetta causata dalla deposizione insufficiente di collagene da parte degli osteoblasti, l'espressione di FAM46B è associata alla nefrite lupica refrattaria, mentre FAM46C è mutato nel 20% dei pazienti con mieloma multiplo, il cancro delle plasmacellule. Un nostro recente studio suggerisce che il mieloma tenda a perdere l'espressione di FAM46C per ridurre la produzione di anticorpi e il conseguente stress, per risparmiare energie per la proliferazione. Tuttavia, i nostri dati mostrano che i membri della famiglia hanno un'elevata variabilità per quanto riguarda la localizzazione cellulare, le proteine con le quali interagiscono e gli effetti che inducono, con molti aspetti ancora da chiarire, tra i quali i ruoli fisiologici di FAM46B e FAM46D. Questa mancanza di conoscenza limita le nostre possibilità di disegnare strategie terapeutiche efficaci e di sfruttare queste proteine come regolatori naturali della secrezione. L'obiettivo di questo progetto è di caratterizzare in modo completo le loro funzioni biologiche e di testarne la rilevanza fisiopatologica e il potenziale terapeutico in modelli di malattia. Crediamo che la precisa definizione dei circuiti molecolari associati alle proteine FAM46 aprirà la strada a nuove strategie terapeutiche non solo contro le malattie associate a queste proteine, ma anche per un'ampia gamma di malattie ereditarie causate dal trasporto compromesso di proteine mutate attraverso la via secretoria.

Disease Name:

Osteogenesis imperfecta; Systemic Lupus Erythematosus; Charcot-Marie-Tooth disease

Nome malattia:

Osteogenesi Imperfetta; Lupus erimatoso sistemico; Malattia di Charcot-Marie-Tooth

Project number:

GJC21079

113. AUTOSOMAL DOMINANT OSTEOPETROSIS TYPE 2 (ADO2): CLOSE TO THE CURE. WHAT TO WE MISS?

Patrizii P.*^[2], Maurizi A.^[2], Ewe A.^[1], Aigner A.^[1], Teti A.M.^[2]

^[1]University of Leipzig ~ Leipzig ~ Germany, ^[2]University of L'Aquila ~ L'Aquila ~ Italy

Autosomal Dominant Osteopetrosis type 2 (ADO2) is a genetic bone disease with high morbidity, due to impairment of osteoclast function, characterized by fragile bones prone to multiple fractures. ADO2 has no cure and patients are treated only palliatively. In this project, we advanced an innovative siRNA therapy that we previously proved to be specific and effective in ADO2 mice. It is based on RNAi-mediated gene knockdown, targeting the heterozygous diseased mRNA encoded by the ADO2 mutant gene, CLCN7, without affecting the normal mRNA. We focused on the Clcn7G213R siRNA (CLCN7G215R siRNA in humans) and tested formulations that could safely and efficiently mediate systemic delivery. To this end, the Clcn7G213R siRNA was complexed with non-viral nanoparticles and two formulations, labelled A and B, were tested in vivo in ADO2 mice. Formulation A was effective but highly toxic at the dose of 4mg/Kg siRNA, administered intraperitoneally 3 days/week for 4 weeks. A lower dose of 2mg/Kg siRNA reduced the mutant Clcn7G213R mRNA expression by 50% in femurs, with a reduction of bone volume over total tissue volume, and improvement of osteoclast number/surface and erosion surface over bone surface in proximal tibia, suggesting improvement of bone resorption. However, this dose did not enhance the bone quality in femurs, which remained fragile. Moreover, the mutant Clcn7G213R mRNA expression was downregulated in lung but not in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or in other visceral organs affected by ADO2, limiting its translational application to improve the extra-skeletal phenotype. By contrast, 4 mg/Kg siRNA in formulation B was well tolerated and most effective in downregulating the mutant Clcn7G213R mRNA expression in bone. It was able to return the bone structural variables, the osteoclast variables and bone resorption to the wild-type level. Furthermore, bone quality recovered and the expression of the mutant Clcn7G213R mRNA was downregulated in PBMCs and in all visceral organs assessed, except for the brain, possibly due to the presence of the blood-brain barrier. Formulation B was then selected for toxicity studies in wild-type mice, which were treated with the maximal siRNA concentration allowed by the nanoparticle formulation (8 mg/Kg siRNA), administered intraperitoneally 5 days/week for two weeks. Results demonstrated no deaths or adverse events. Treatment was well tolerated, with no topical reactions at the site of injection and no impairment of walking ability or alterations in behaviour and food intake. Consistently, weight gain was normal over the two weeks of treatment and, at sacrifice, the weights of visceral organs, including brains, lungs, hearts, kidneys, livers, and spleens, showed no changes compared to control mice treated with saline. In conclusion, our results indicate that the Clcn7G213R siRNA nanoparticle formulation B provides a promising avenue for future development of a RNAi-based therapy for ADO2 patients.

L'osteopetrosi autosomica dominante di tipo 2 (ADO2) è una malattia genetica ossea causata dalla compromissione della funzione di cellule denominate osteoclasti. Essa è caratterizzata da ossa fragili soggette a fratture multiple e non ha cura. In questo progetto, abbiamo migliorato una nuova terapia sperimentale mediante una molecola chiamata siRNA da noi sviluppata, la quale riduce l'espressione del gene mutato CLCN7, senza influenzare l'espressione del gene normale. In particolare, abbiamo utilizzato un siRNA contro la mutazione Clcn7G213R (siRNA CLCN7G215R

nell'uomo) attivo in tutto l'organismo. A tal fine, il siRNA Clcn7G213R è stato somministrato in combinazione con piccole particelle (nanoparticelle) diverse dai virus. Due formulazioni, che abbiamo chiamato A e B, sono state somministrate in vivo in topi ADO2. La formulazione A è risultata efficace ma altamente tossica alla dose di 4 mg/Kg di siRNA, somministrata per via intraperitoneale 3 giorni alla settimana per 4 settimane. Una dose più bassa (2mg/Kg di siRNA) ha ridotto l'espressione del gene mutato nei femori, inducendo un miglioramento significativo delle alterazioni ossee. Al contrario, questa dose non ha migliorato la qualità dell'osso, il quale è rimasto fragile. Inoltre, l'espressione del gene mutato si è ridotta nei polmoni ma non nelle cellule del sangue o in altri organi affetti dall'ADO2, limitando così gli effetti della cura. Al contrario, la formulazione B, somministrata alla dose di 4 mg/Kg di siRNA, è stata ben tollerata e più efficace nel ridurre l'espressione del gene mutato nell'osso, ripristinando condizioni simili a quelle dei topi normali. Inoltre, la qualità dell'osso è migliorata. Infine, l'espressione del gene mutato è stata ridotta nelle cellule del sangue ed in tutti gli altri organi valutati, tranne il cervello, probabilmente a causa della barriera presente fra questo ed il sangue. La formulazione B è stata quindi selezionata per studi di tossicità in topi non malati, i quali sono stati trattati con la massima concentrazione di siRNA consentita dalla combinazione con le nanoparticelle (8 mg/Kg siRNA), somministrata per via intraperitoneale 5 giorni alla settimana per due settimane. Il trattamento non ha causato decessi né ha indotto effetti collaterali quali reazioni cutanee nel sito di iniezione, compromissione della capacità di camminare, o cambiamenti del comportamento e dell'assunzione di cibo. Coerentemente con queste osservazioni, il peso dei topi è aumentato progressivamente in modo normale e, dopo il sacrificio, i pesi di cervello, polmoni, cuore, reni, fegato e milza non hanno mostrato cambiamenti rispetto ai pesi degli stessi organi in topi di controllo trattati solo con la soluzione salina usata per somministrare la terapia. In conclusione, i nostri risultati indicano che la formulazione B di siRNA Clcn7G213R-nanoparticelle potrebbe essere sfruttata per lo sviluppo futuro di una cura efficace per i pazienti affetti da ADO2.

Disease Name:

Osteopetrosis, autosomal dominant type 2

Nome malattia:

Osteopetrosi autosomica dominante di tipo 2

Project number:

GGP19031

114. EX VIVO EXPANSION OF HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS (HSPC) FOR GENE THERAPY

Zonari E.^[1], Barcella M.^[1], Volpin M.^[1], Naldini M.^[1], Desantis G.^[1], Merelli I.^[2], Montini E.^[1], Gentner B.^[1]

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET) ~ Milan ~ Italy, ^[2]National Research Council, Institute for Biomedical Technologies ~ Milan ~ Italy

Ex vivo expansion of HSPC is an unmet medical need in gene therapy and regenerative medicine, to compensate for HSPC loss during manufacturing, to enable ex vivo gene therapy for young infants where leukapheresis is unfeasible & large volume bone marrow (BM) harvest is unsafe and to enable more complex genetic engineering such as gene editing & selection of engineered cells. We have optimized a small molecule-based expansion protocol for genetically engineered mPB HSPC starting from our previous studies (Zonari E. et al.). We first evaluated 2 HSC agonists, UM171 (Horwitz, M.E. et al.) and SR1 (Wagner, J. E. et al.), in their capacity to support short-term and long-term engraftment. Next, we investigated the best cytokine cocktail to have good growth and maintenance of a primitive immunophenotype that resulted in a net gain in primitive cells,

which translated into higher engraftment. Moreover, lentiviral transduction was not completely neutral, even when purified vectors were used, and counteracted the expansion of primitive cells. Transduction enhancers (TEs) had variable effects, with some molecules showing strong antagonism to HSC expansion. By optimising the choice of TEs and the timing of transduction, we were able to neutralise the negative effects of the genetic engineering step. We also evaluate clonal analysis of an expanded (EX) versus a minimally-manipulated (MM) HSPC graft. A lentiviral vector library, whereby each particle contains a unique barcode sequence (BAR-LV), was generated, and validated for NGS detectability & complexity. MPB CD34+ HSPC were transduced with BAR-LV yielding on average two copies per cell. Human CD45+ engraftment at 16 weeks was similar between MM and EX when the same starting cell dose equivalent was transplanted. Graft clonality gave similar results. The graft was polyclonal with no evidence of clonal dominance. The number of unique clones was higher in the EX compared to the MM group at the same starting dose equivalent. These novel readouts will facilitate the development of improved expansion protocols. In conclusion, we present a revisited expansion protocol based on clinically-validated compounds and tailored to genetically-engineered mPB HSC, towards harnessing the full potential of ex vivo HSC expansion in the gene therapy context.

Espansione Ex vivo di cellule staminali ematopoietiche (CSE) per la terapia genica

L'espansione ex vivo delle cellule staminali ematopoietiche (CSE) è un'esigenza medica al momento insoddisfatta nel campo della terapia genica e nella medicina rigenerativa. L'espansione di CSE è importante per compensare la loro perdita durante la produzione, per consentire la terapia genica ex vivo nei neonati in cui la leucaferesi non è fattibile e il prelievo di grandi volumi di midollo osseo non è sicuro e per consentire un'ingegneria genetica più complessa, come l'editing genico e la selezione delle cellule ingegnerizzate. Abbiamo ottimizzato un protocollo di espansione per le CSE geneticamente modificate ottenute da sangue mobilizzato basato su small molecules. Abbiamo dapprima valutato due agonisti delle CSE, UM171 e SR1, e abbiamo verificato che UM171 da solo è in grado di fornire lo stesso attecchimento a lungo termine della sua combinazione con SR1. Successivamente, abbiamo studiato il miglior cocktail di citochine per ottenere una buona crescita e il mantenimento delle loro caratteristiche concludendo che l'inclusione di IL3 e IL6 nel cocktail standard ha portato a un incremento di cellule primitive, che si è tradotto in un maggiore attecchimento. Inoltre, la trasduzione con vettori lentivirali non è completamente neutra. Anche quando vengono utilizzati vettori purificati, abbiamo osservato un impatto negativo sull'espansione delle cellule primitive. Anche l'utilizzo di adiuvanti di trasduzione (TE) hanno dato effetti variabili, con alcune molecole che hanno mostrato un forte antagonismo all'espansione delle CSE. Ottimizzando la scelta dei TE e la tempistica della trasduzione, siamo riusciti a neutralizzare gli effetti negativi della fase di ingegneria genetica. Abbiamo valutato anche l'analisi clonale di un trapianto di CSE espanse (EX) rispetto a cellule che hanno subito una manipolazione minima (MM) in un modello murino umanizzato. È stata generata una libreria di vettori lentivirali, in cui ogni particella contiene un codice a barre unico (BAR-LV). L'incidenza di CD45+ umane a 16 settimane è risultata simile tra MM ed EX trapiantando dosi iniziali equivalenti di cellule. La clonalità del trapianto ha dato risultati sorprendentemente simili. L'attecchimento era policlonale senza alcuna evidenza di cloni dominanti. Il numero di cloni unici era maggiore nel gruppo EX rispetto al gruppo MM a parità di dose equivalente iniziale. In conclusione, presentiamo un protocollo di espansione rivisitato, basato su composti validati clinicamente e adattato alle CSE mPB geneticamente ingegnerizzate, per sfruttare appieno il potenziale dell'espansione ex vivo delle CSE nel contesto della terapia genica.

Disease Name:

Osteopetrosis, malignant autosomal recessive

Nome malattia:

Osteopetrosi, autosomica recessiva

Project number:

TGT22C08

115. ELUCIDATING THE SIGNIFICANCE OF OSTEOPETROTIC BONE MARROW NICHE IN HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS, AND ITS IMPLICATIONS FOR STEM CELL THERAPY

Capo V.^[1], Penna S.^[2], Zecchilo A.^[1], Diverniere M.^[2], Zonari E.^[2], Naldini M.^[2], Merelli I.^[3], Barcella M.^[2], Draghici E.^[2], Scanziani E.^[4], Cappelleri A.^[4], Crisafulli L.^[5], Ficara F.^[5], Sobacchi C.^[5], Gentner B.^[2], Villa A.^{*[1]}

^[1]SR Tiget, CNR IRGB ~ Milano ~ Italy, ^[2]SR Tiget, San Raffaele Institute ~ Milano ~ Italy, ^[3]SRTiget, ITB CNR ~ Milano ~ Italy, ^[4]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Milano ~ Milano ~ Italy, ^[5]CNR IRGB, Istituto Clinico Humanitas ~ Milano ~ 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 (BM) cavity and increased number of circulating CD34+ cells. Symptoms include dense and brittle bones, anaemia, and progressive nerve compression, leading to death in the first decade of life. To date, allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is the treatment of choice, but its application is limited by availability of HLA-matched donor, toxicity of conditioning regimens and significant transplant-related morbidity. Gene therapy (GT) represents an alternative option. We have established a novel GT platform coupling lentiviral transduction of circulating CD34+ cells with ex-vivo UM171-mediated expansion, to maximize the chance of infusing a saturating dose of gene-corrected hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) into the patients. We aim to consolidate the GT procedure characterizing the circulating CD34+ cells as a new HSPC source, investigating the effect of mobilization on the fibrotic BM niche and assessing the effect of novel non genotoxic conditioning.

We set up single cell RNA-sequencing on CD34+ cells from healthy donor cord blood. Preliminary results show that the transcriptomic profile at day 0 differs from that of cells at the end of the expansion period (day 8), while transduction has a minor impact. Of note, cluster of cells with signature of primitive HSCs are still present at day 8, in line with the maintained HSC stemness that we observed in vivo in NSG mice. The assessment of single-cell transcriptomic profile of circulating CD34+ cells from ARO patients is ongoing and will be instrumental to understand the suitability of this source for the GT.

The high frequency of circulating CD34+ cells, especially in younger patients, has been exploited for the collection of backups before HSC transplant. We modelled the efficacy of drug-induced mobilization in the fibrotic BM niche of the osteopetrotic oc/oc mouse model. We observed the Plerixafor-induced mobilization of HSPCs in the oc/oc mice at post-natal day 7. Finally, to reduce the burden of conditioning toxicity, we tested the efficacy of antibody-drug conjugates in promoting donor cell engraftment in the oc/oc mice. Conditioning with anti-CD45 conjugated to saporin showed a low but stable engraftment of donor cells in blood and hematopoietic organs, allowing the long-term survival of oc/oc mice well beyond their expected lifespan of 3 weeks.

Data from this project will be instrumental to tailor the gene therapy protocol to the peculiarity of ARO disease, with the final aim to improve the outcome and reduce to burden for patients.

Analisi della nicchia osteopetrotica e la sua implicazione nella terapia genica

La osteopetrosi maligna infantile causata da difetti nel gene TCIRG1 è una malattia severa caratterizzata da fibrosi ossea, epatosplenomegalia e progressiva fibrosi del midollo osseo con

conseguente immunodeficienza e aumentata suscettibilità a sviluppare infezioni. La malattia porta a morte nel primo anno di vita se non trattata da trapianto ematopoietico che rimane il trattamento di scelta e il cui successo rimane limitato dato il numero ristretto di donatori compatibili, gli effetti severi della terapia di condizionamento che precede il trapianto e gli eventi avversi legati alla fase post-trapianto. Per curare questa malattia e superare tali difficoltà, abbiamo sviluppato una piattaforma innovativa di terapia genica sfruttando un nuovo protocollo di trasduzione ed espansione di cellule staminali ematopoietiche che circolano spontaneamente nel sangue periferico di questi pazienti. In questo progetto, ci proponiamo di studiare il profilo molecolare e cellulare delle cellule staminali ematopoietiche circolanti nel sangue dei pazienti e gli effetti della terapia genica sul loro profilo trascrizionale oltre a valutare l'impatto che la malattia ha sulla staminalità di queste cellule e sulla loro quiescenza. In parallelo, valuteremo la fattibilità e l'efficacia della mobilizzazione in assenza di una nicchia del midollo e la efficacia di nuovi condizionamenti non genotossici sfruttando il modello murino della malattia. In parallelo, ci proponiamo di generare un nuovo modello murino osteopetrotico umanizzato da utilizzare come strumento per lo studio della biologia delle cellule staminali ematopoietiche circolanti corrette dalla terapia genica. In conclusione, ci aspettiamo che i risultati di questo studio permettano una maggior implementazione della piattaforma di terapia genica da offrire ai pazienti per la cura di questa severa malattia.

Disease Name:

Osteopetrosis, malignant autosomal recessive

Nome malattia:

Osteopetrosi, autosomica recessiva

Project number:

TGT22C18

116. STRUCTURAL-FUNCTIONAL ANALYSIS OF CLC PROTEIN FAMILY

Fiore M., Lagostena L., Piccolo A.*

Institute of Biophysics, CNR ~ Genova ~ Italy

The most abundant anion in the human body is chloride, which is necessary for metabolism, for maintenance of the membrane potential, and for keeping acid-basic balance in cellular compartments. Members of the CLC family of chloride transporting proteins are essential mediators of the Cl⁻ movement across cellular membranes. The human genome encodes 9 CLC genes; of these 5 are Cl⁻/H⁺ exchangers and 4 are Cl⁻ channels. Defects in genes encoding CLC proteins or their auxiliary subunits are associated with muscle, bone, kidney, and brain genetic diseases such as myotonia congenita (CLCN1), osteopetrosis and lysosomal storage disease (CLCN7 and OSTM1), Bartter syndrome (CLCNK and BSND) Dent's disease (CLCN5) and neurological genetic disorders coupled with intellectual disability (CLCN2, CLCN4, CLCN3, CLCN6). Currently in the lab, through a combination of electrophysiological techniques, fluorescence and biochemical assays we are interested in:

1. The investigation of functional properties of mutations causing diseases and their phenotype-genotype classification. The identification and description of the protein functional alteration induced by missense mutations could provide indication on the severity of the disease and could suggest possible treatments.
2. Exploring the possibility to use molecular chaperones inhibitors as potential drugs for the treatment of genetic diseases caused by defects on CLCNs genes. Modulation of the activity of

chaperones could offer a great possibility to influence protein homeostasis and cell survival making it a potential drug target.

3. The application of AI algorithms for prediction of functional defects and therapeutic treatments.

Our hope is to identify new molecular targets, and new analysis approaches to provide new tools for the treatment of CLC genetic diseases.

Studi strutturali e funzionali dei complessi proteici CLC coinvolti in malattie genetiche.

L'anione più abbondante nel corpo umano è il cloruro, necessario per il metabolismo, per il mantenimento del potenziale di membrana e per mantenere l'equilibrio acido-basico nei compartimenti cellulari. I membri della famiglia CLC delle proteine di trasporto del cloruro sono mediatori essenziali del movimento Cl attraverso le membrane cellulari. Il genoma umano codifica 9 geni CLC; di questi 5 sono scambiatori Cl-/H⁺ e 4 sono canali Cl-. Difetti nei geni che codificano per le proteine CLC o le loro subunità ausiliarie sono associati a malattie genetiche muscolari, ossee, renali e cerebrali come la miotonia congenita (CLCN1), l'osteopetrosi e la malattia da accumulo lisosomiale (CLCN7 e OSTM1), la sindrome di Bartter (CLCNK e BSND) (CLCN5) e disturbi genetici neurologici associati a disabilità intellettiva (CLCN2, CLCN4, CLCN3, CLCN6). Attualmente in laboratorio, attraverso una combinazione di tecniche elettrofisiologiche, fluorescenza e saggi biochimici siamo interessati a:

1. Lo studio delle proprietà funzionali delle mutazioni che causano malattie e la loro classificazione fenotipo-genotipo. L'identificazione e la descrizione dell'alterazione funzionale proteica indotta da mutazioni missenso potrebbe fornire indicazioni sulla gravità della malattia e suggerire possibili trattamenti.

2. Esplorare la possibilità di utilizzare inibitori di chaperoni molecolari come potenziali farmaci per il trattamento di malattie genetiche causate da difetti sui geni CLCN. La modulazione dell'attività degli chaperoni potrebbe offrire una grande possibilità di influenzare l'omeostasi proteica e la sopravvivenza cellulare, rendendola un potenziale bersaglio di farmaci.

3. L'applicazione di algoritmi AI per la previsione di difetti funzionali e trattamenti terapeutici.

La nostra speranza è di identificare nuovi bersagli molecolari e nuovi approcci di analisi per fornire nuovi strumenti per il trattamento delle malattie genetiche CLC.

Disease Name:

Osteopetrosis; Bartter syndrome

Nome malattia:

Osteopetrosis; Sindrome di Bartter

Project number:

TCP14008

Genetic cardiac disease

117. DEVELOPMENT OF SUBTYPE-SPECIFIC CARDIOMYOCYTE MODELS TO UNRAVEL DISTINCT CELLULAR MECHANISMS OF LMNA-CARDIOMYOPATHY

Crasto S.^[1], Mazzola M.^[2], Salvarani N.^[1], Peano C.^[1], Albano C.^[2], Puccio S.^[1], Occhetta P.^[3], Di Pasquale E.^[1]

^[1]Institute of Genetic and Biomedical Research ~ UOS Milan ~ Italy, ^[2]Humanitas Research Hospital ~ Rozzano (Milan) ~ Italy, ^[3]BiomimiX & Politecnico di Milano ~ Milan ~ Italy

LMNA-Cardiomyopathy (or CardioLaminopathy, LMNA-CMP) is a form of inherited cardiomyopathy. It belongs to a group of rare disorders (the laminopathies) caused by mutations in the LMNA gene, encoding the nuclear lamina proteins Lamin A and C, which are involved in many biological processes. Indeed, besides their well-known structural role, Lamin A/C are also emerging as key players in transcriptional regulation and chromatin architecture.

Phenotypes associated to their mutations are extremely various and affect several tissues, including the myocardium. At the heart level, the main phenotype is dilated cardiomyopathy associated with a high rate of conduction abnormalities and fatal arrhythmias, which can have an extremely heterogeneous presentation, without obvious genotype-phenotype correlations.

Despite recent advances, most of the current knowledge on LMNA-CMP stems from mouse models and non-cardiac cells, while the mechanisms by which Lamin A/C mutations alter the electrical/mechanical properties of human heart cells remain under-assessed. Similarly, the effect of Lamin A/C mutations on epigenetic regulation, which may be at the basis of the clinical heterogeneity of the disease, is still unexplored in cardiac-relevant cells.

In order to fill this knowledge gap, we aim to define the distinct roles of Lamin A/C in human cardiomyocyte subtypes and mechanisms of transcriptional regulation underlying cell-specific LMNA-CMP phenotypes.

To this end, we will combine induced pluripotent stem cells (iPSCs) and iPSC-derived specific heart muscle cell types, 3D on-chip and single-cell functional tests and epigenomic sequencing methods to identify new disease pathways and biological targets for the development of more-specific therapies for LMNA-CMP.

Sviluppo di modelli cardiaci per l'identificazione di meccanismi cellulari di cardio-laminopatia in sottotipi cardiomiocitari specifici.

Il focus principale dello studio è la cardiomiopatia da LMNA (LMNA-CMP), una forma ereditaria di cardiomiopatia - malattia del muscolo cardiaco - causata da mutazioni nel gene della Lamina A/C (LMNA). La LMNA-CMP fa parte di un gruppo di malattie, chiamate laminopatie, caratterizzate da diversi fenotipi clinicamente distinti, principalmente tessuto-specifici. Il principale fenotipo cardiaco è la cardiomiopatia dilatativa associata a vari disturbi della conduzione e aritmie, che possono presentarsi in modo estremamente eterogeneo, indipendentemente dalla mutazione associata. Infatti, l'eterogeneità è un tratto distintivo di tutte le laminopatie, il cui meccanismo di base rimane da stabilire.

Analogamente, le funzioni biologiche della Lamina A/C nel cuore non sono completamente chiarite e le conoscenze acquisite finora provengono principalmente da modelli animali e da cellule non cardiache, che possono mancare di alcune funzioni di Lamina A/C specifiche del tessuto. Mentre il ruolo di queste proteine come componenti strutturali del nucleo e nell'accoppiamento nucleocitoscheletro è ben conosciuto, la comprensione della loro azione come modulatori della trascrizione genica è ancora agli inizi, soprattutto in cellule cardiache.

In nostro obiettivo principale è determinare se la Lamina A/C possa avere ruoli distinti nei diversi

sottotipi di cardiomiociti che compongono il miocardio (cellule atriali, ventricolari, nodali) e verificare se queste funzioni distinte possano essere alla base della manifestazione eterogenea della malattia.

A questo scopo, utilizzeremo modelli cellula-specifici generati mediante differenziamento di cellule staminali pluripotenti indotte, e integreremo metodologie innovative e fondamentali per studi funzionali e molecolari, al fine di identificare nuovi meccanismi patologici e bersagli terapeutici di LMNA-CMP

Disease Name:

Cardiomyopathy Dilated 1°

Nome malattia:

Cardiomiopatia Dilatativa 1°

Project number:

GMR22T1093

118. STUDY OF THE AMYLOIDOGENIC CONVERSION OF S52P AND V122I TRANSTHYRETIN VARIANTS BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE: ELUCIDATION OF THE MOLECULAR MECHANISMS LEADING TO ATTR AMYLOIDOSIS.

Cantarutti C.*^[1], Verona G.^[2], Mimmi M.C.^[3], Mangione P.^[3], Giorgetti S.^[3], Bellotti V.^[4], Corazza A.^[1]

^[1]Università di Udine; Dipartimento di Area Medica ~ Udine ~ Italy, ^[2]Centre for Amyloidosis and Acute Phase Proteins, University College London ~ London ~ United Kingdom, ^[3]Università di Pavia; Dipartimento di Medicina Molecolare ~ Pavia ~ Italy, ^[4]Direzione Scientifica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo ~ Pavia ~ Italy

Transthyretin (TTR) related amyloidosis (ATTR) is a systemic disease caused by the deposition of TTR in the form of insoluble amyloid fibres. ATTR is a progressive, fatal disease with approximately 130 mutations reported for the rare hereditary forms of the disease. The involvement is mainly polyneuropathic or cardiac and a median age of onset of 39 years [1], with different mutations responsible for different phenotypes and severity of progression. In this study, we focus on the two variants Val122Ile (V122I) and Ser52Pro (S52P), the first of which is responsible for late-onset cardiomyopathy and the second for early-onset aggressive polyneuropathy followed by cardiomyopathy. All variants have been structurally characterized by X-ray but show no significant difference with wild-type TTR (WT-TTR) [1-5]. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) can uniquely provide structural details as well as information on protein dynamics in terms of fast and slow motions and in term of population of different conformers which can help to understand the different pathological outcomes in terms of both prognosis and organ involvement.

STUDIO DELLA CONVERSIONE AMILOIDOGENICA DELLE VARIANTI DI TRANSTIRETINA S52P E V122I MEDIANTE RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE: CHIARIMENTO DEI MECCANISMI MOLECOLARI CHE PORTANO ALLA FORMAZIONE DI AMILOIDE.

L'amiloidosi da transtiretina (TTR) (ATTR) è una malattia sistemica causata dalla deposizione di TTR sotto forma di fibre amiloidi insolubili. L'ATTR è una malattia progressiva e fatale con circa 130 mutazioni segnalate per le forme ereditarie e rare della malattia. Il coinvolgimento è principalmente a livello dei nervi periferici o cardiaco con un'età media di insorgenza di 39 anni [1], in cui le diverse mutazioni sono responsabili per i diversi fenotipi e per la gravità della progressione. In questo studio, ci concentriamo su due varianti Val122Ile (V122I) e Ser52Pro (S52P), la prima delle quali è responsabile della cardiomiopatia ad esordio tardivo e la seconda

della polineuropatia aggressiva ad esordio precoce seguita dalla cardiomiopatia. Tutte le varianti sono state strutturalmente caratterizzate mediante cristallografia ai raggi X ma non mostrano differenze significative con la TTR wild-type (WT-TTR) [1-5]. La risonanza magnetica nucleare (NMR) può fornire in modo univoco dettagli strutturali e informazioni sulla dinamica delle proteine in termini velocità dei moti e sulla presenza di diversi conformeri, aspetti che possono aiutare a comprendere i diversi esiti patologici sia in termini di prognosi che di coinvolgimento degli organi.

Disease Name:

Hereditary transthyretin amyloidosis

Nome malattia:

Amiloidosi ereditaria da transtiretina

Project number:

GMR22T1067

119. HERG POTASSIUM CHANNEL ENHANCERS AS A NOVEL THERAPEUTIC APPROACH FOR LONG QT SYNDROME

Tavazzani E.^[1], Kumawat A.^[2], Trancuccio A.^[3], Kukavica D.^[3], Mazzanti A.^[3], Denegri M.^[1], Milani G.^[4], Cavalluzzi M.M.^[4], Lentini G.^[4], Camilloni C.^[2], Priori S.G.^[1]

^[1]Molecular Cardiology, IRCCS Istituti Clinici Scientifici Maugeri ~ Pavia ~ Italy, ^[2]Department of Biosciences, University of Milan ~ Milan ~ Italy, ^[3]Department of Molecular Medicine, University of Pavia 27100 ~ Pavia ~ Italy, ^[4]Department of Pharmacy – Pharmaceutical Sciences, University of Bari ~ Bari ~ Italy

Introduction: Long QT Syndrome (LQTS) predisposes young patients to develop ventricular fibrillation leading to sudden cardiac death. QT interval duration is a powerful predictor of arrhythmic events, with every 10ms increase translating into a 15% increase in risk¹. Our group showed that substrate-specific therapy with mexiletine, which shortens the QT, confers arrhythmic protection in LQT3,2,3. This suggests that, in principle, shortening the QTc interval is an effective strategy for treating all forms of LQTS. We tested the hypothesis that a novel class of antiarrhythmics that enhance the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current (IKr), named HERG activators⁴, might be able to shorten the duration of cardiac repolarization in different LQTS.

Methods: We tested the efficacy and safety of different drugs, and we selected ICA-1055745 as the most potent hERG channel activator in different models of LQTS, combining in vitro, in vivo, and in silico approaches. We first tested the effects of ICA-105574 in HEK cells expressing KCNH2 mutations (A561V, G628S, L779P) derived from our cohort of LQT2 patients. Subsequently, we tested the compound in a drug-induced guinea pig model of LQT2 (due to KCNH2 mutations) by sotalol, a HERG blocker; of LQT3 (due to SCN5A mutations) by Anthopleurin-A, which impairs NaV1.5 inactivation; and of LQT8 (due to CACNA1C mutations) by BayK8644, a CaV1.2 agonist. Finally, following the recent determination of the high-resolution structure of the hERG channel through cryo-electron microscopy⁶, we investigated in silico the mechanism of action of ICA-105574 in wild-type hERG channel and G628S mutation.

Results: Patch-clamp experiments showed that LQT2 mutations cause functional defects in hERG channel and only G628S and L779P mutations induced drastic reduction in IKr amplitude, while 105574 increased the IKr amplitude only in A561V and G628S. After the confirmation of the desired effect on the IKr current, we conducted in vivo experiments. We observed that ICA-105574 administration induced a pronounced and statistically significant shortening of the QTc interval in

LQT2 (295±9ms vs. 254±4ms), LQT3 (293±4ms vs. 256±14ms) and LQT8 (288±10ms vs. 234±7ms) ($p < 0.001$ for all). Relevantly, no arrhythmic events were observed. Finally, through molecular dynamics simulations, we determined that ICA-105574 can stabilize a pattern of molecular interactions similar to those of some KCNH2 gain-of-function mutations causing Short QT Syndrome and revert the dramatic conformational modifications resulting from the KCNH2-G628S mutation. In silico results also indicate an accurate pose and mechanism of action for ICA-105574 and suggest that molecular dynamics simulations can be used to assess the efficacy and toxicity of novel compounds.

Conclusions: hERG channel enhancers represent a viable, safe, and potentially very powerful novel therapeutic strategy for patients with all forms of LQTS.

Agonisti di hERG come nuova strategia terapeutica per la Sindrome del QT Lungo

La sindrome del QT lungo (LQTS) è una patologia ereditaria del cuore che causa morte improvvisa in giovani individui. La terapia con betabloccanti è efficace in molti pazienti, ma alcune forme della malattia (es. LQT2, LQT3, LQT8) sono scarsamente responsive. Tali sindromi rientrano nelle cosiddette “canalopatie”, ovvero patologie causate dal malfunzionamento di proteine note come “canali ionici”. Il passaggio di ioni (ad es. potassio, sodio, calcio) attraverso tali canali ionici genera delle correnti elettriche nel cuore che possono essere registrate attraverso l'elettrocardiogramma (ECG). Nella LQTS, il difetto a carico dei canali ionici determina un prolungamento di un intervallo misurabile sull'ECG, chiamato “intervallo QT”.

Lo scopo del nostro progetto è stato identificare cure innovative per le varianti più severe della LQTS, che siano in grado di accorciare tale intervallo QT. Dato che uno dei principali responsabili della durata dell'intervallo QT è il canale hERG, attraverso cui passa lo ione potassio, abbiamo testato l'efficacia di una classe di nuovi farmaci chiamati “attivatori di hERG”.

Abbiamo prima sviluppato dei modelli cellulari che ci permettessero di: a) riprodurre i difetti dei canali ionici dei pazienti LQTS; b) capire che effetti avessero sulla corrente del canale hERG; c) selezionare il farmaco attivatore di hERG più efficace. Individuata quindi la molecola più efficace, siamo passati alla fase successiva di sperimentazione, in cui abbiamo sviluppato tre modelli animali (porcellini d'india) per le tre varianti più severe del QT lungo: LQT2, LQT3, LQT8. Tali esperimenti hanno confermato che il farmaco attivatore di hERG è sicuro ed efficace nell'abbreviare la durata dell'intervallo QT, riportandolo a valori normali, in tutte e tre le forme di LQTS studiate.

Infine, abbiamo condotto degli studi computazionali (ovvero simulazioni con software molto sofisticati) per studiare in modo dettagliato l'azione molecolare del farmaco sulla struttura del canale hERG. Abbiamo quindi simulato il funzionamento del canale normale (“sano”) e del canale con una mutazione causativa di LQT2, in presenza/assenza della molecola attivatrice di hERG. Le simulazioni ci hanno permesso di osservare come il farmaco agisca sull'attività del canale attraverso la stabilizzazione di alcuni elementi strutturali vicini che sono gli stessi su cui agiscono mutazioni che aumentano la funzionalità del canale. Inoltre, le simulazioni mostrano come questi cambiamenti riescano a ripristinare l'attività del canale mutato. Tali studi computazionali potranno essere usati come punto di partenza anche per lo sviluppo futuro di nuove molecole.

In conclusione, in questo progetto abbiamo testato e confermato l'ipotesi che l'utilizzo di una nuova classe di farmaci, chiamati “attivatori di hERG”, può rappresentare una nuova, potente e promettente strategia terapeutica per diverse forme di LQTS.

Disease Name:

Long QT Syndrome

Nome malattia:

Sindrome del QT lungo familiare

Project number:

GGP19134

Genetic developmental defect during embryogenesis

120. MODULATION OF NBAS-RELATED FUNCTIONS IN THE EARLY RESPONSE TO SARS-COV-2 INFECTION

Granata V.^[1], Pagani I.^[2], Morengi E.^[1], Schiavone M.L.^[1], Lezzi A.^[2], Ghezzi S.^[2], Vicenzi E.^[2], Poli G.^[2], Sobacchi C.*^[3]

^[1]IRCCS Humanitas Research Hospital ~ Rozzano ~ Italy, ^[2]San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy, ^[3]CNR-IRGB, UOS di Milano ~ Milano ~ Italy

Upon infection, severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is predicted to interact with diverse cellular functions, such as the nonsense-mediated decay (NMD) pathway, as suggested by the identification of the core NMD factor upframeshift-1 (UPF1) in the SARS-CoV-2 interactome, and the retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum (ER) through the endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment (ERGIC), where corona-virus assembly occurs. Here, we investigated the expression and localization of the neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) protein, a UPF1 partner for the NMD at the ER, participating also in retrograde transport, and of its functional partners, at early time points after SARS-CoV-2 infection of the human lung epithelial cell line Calu3. We found a significant decrease of DEXH-Box Helicase 34 (DHX34), suppressor with morphogenetic effect on genitalia 5 (SMG5), and SMG7 expression at 6 h post-infection, followed by a significant increase of these genes and also UPF1 and UPF2 at 9 h post-infection. Conversely, NBAS and other genes coding for NMD factors were not modulated. Known NMD substrates related to cell stress (Growth Arrest Specific 5, GAS5; transducin beta-like 2, TBL2; and DNA damage-inducible transcript 3, DDIT3) were increased in infected cells, possibly as a result of alterations in the NMD pathway and of a direct effect of the infection. We also found that the expression of unconventional SNARE in the ER 1, USE1 (p31) and Zeste White 10 homolog, ZW10, partners of NBAS in the retrograde transport function, significantly increased over time in infected cells. Co-localization of NBAS and UPF1 proteins did not change within 24 h of infection nor did it differ in infected versus non-infected cells at 1 and 24 h after infection; similarly, the co-localization of NBAS and p31 proteins was not altered by infection in this short time frame. Finally, both NBAS and UPF1 were found to co-localize with SARS-CoV-2 S and N proteins. Overall, these data are preliminary evidence of an interaction between NBAS and NBAS-related functions and SARS-CoV-2 in infected cells, deserving further investigation.

Dopo l'infezione, il virus SARS-CoV-2 interagisce con diverse funzioni cellulari, tra cui la via del decadimento mediato da nonsense (nonsense-mediated decay, NMD), come suggerito dall'identificazione del fattore centrale dell'NMD chiamato UPF1 nell'interattoma di SARS-CoV-2, e il trasporto retrogrado dal Golgi al reticolo endoplasmatico passando attraverso il comparto intermedio tra il reticolo endoplasmatico e il Golgi (detto ERGIC), dove si verifica l'assemblaggio dei coronavirus. In questo progetto, abbiamo studiato l'espressione e la localizzazione della proteina NBAS, un partner di UPF1 nel processo di NMD che avviene al reticolo endoplasmatico, che partecipa anche al trasporto retrogrado, e dei suoi partner funzionali, nei primi momenti dopo l'infezione da SARS-CoV-2 nella linea cellulare umana di epitelio polmonare Calu3. Abbiamo trovato una significativa diminuzione dell'espressione dei geni DHX34, SMG5 e SMG7 a 6 ore dall'infezione, seguita da un aumento significativo di questi geni e anche di UPF1 e UPF2 a 9 ore dall'infezione. Al contrario, non è risultato che NBAS e altri geni che codificano per fattori dell'NMD siano modulati in quell'intervallo di tempo. L'espressione di alcuni geni che notoriamente sono substrati di NMD e sono correlati a stress cellulare (GAS5, TBL2, DDIT3) sono risultati aumentati nelle cellule infette, probabilmente a causa di alterazioni nel meccanismo di NMD e di un effetto diretto dell'infezione. Abbiamo anche osservato che l'espressione di p31 e ZW10, che sono partner di NBAS nella funzione di trasporto retrogrado, aumenta significativamente nel tempo nelle cellule

infette. La co-localizzazione delle proteine NBAS e UPF1 non cambia entro 24 ore dall'infezione e non è diversa nelle cellule infette rispetto a quelle non infette a 1 e 24 ore dall'infezione; allo stesso modo, la co-localizzazione delle proteine NBAS e p31 non è alterata dall'infezione in questo breve lasso di tempo. Infine, abbiamo osservato che sia NBAS che UPF1 co-localizzano con le proteine S ed N di SARS-CoV-2. Nel complesso, questi dati costituiscono evidenze preliminari di un'interazione tra NBAS, e funzioni ad esso correlate, e SARS-CoV-2 nelle cellule infette, che merita ulteriori indagini.

Disease Name:

Acrofrontofacionasal dysostosis; COVID-19

Nome malattia:

Disostosi acro-fronto-facio-nasale

Project number:

GSP20006_Covid025

121. ZEBRAFISH AS MODEL FOR CATEL-MANZKE SYNDROME: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DANIO RERIO TGDS

Coppola M.R.C.^[1], Bellitto D.^[2], Bozzo M.^[2], Candiani S.^[2], Tonetti M.*^[1]

^[1]Department of Experimental Medicine - University of Genova ~ Genova ~ Italy, ^[2]Department of Earth, Environment and Life Sciences - University of Genoa ~ Genova ~ Italy

Catel-Manzke syndrome (CMS) is a rare autosomal recessive disorder characterized by the presence of the Pierre-Robin sequence (micrognathia, glossoptosis and cleft palate) and clinodactylia of the index fingers caused the presence of an extra bone at the base of the first phalanx (1). Associated skeletal abnormalities and heart defects have also been observed. To date 41 affected individuals have been reported, displaying homozygous and compound-heterozygous mutations in the TGDS gene (2). TGDS is currently annotated in the database as dTDP-glucose 4,6 dehydratase, due to its homology with the bacterial enzymes involved in the dTDP-rhamnose biosynthetic pathway; however, this pathway was never reported in vertebrates. The homology with enzymes of nucleotide sugar metabolism and the clinical presentation of CMS led to the suggestion that TGDS could be involved in glycosaminoglycan (GAG) formation (3). However, no biochemical evidence is available and TGDS function remains unknown.

In the perspective of developing a model to study the defects observed in CMS, we have identified and characterized zebrafish Tgds. The gene is not currently annotated in GRCz11 assembly; thus, other assemblies of chromosome 6 were used to identify the gene structure. Two mRNA isoforms are reported in the databases, due to alternative splicing; one, indicated as the reference transcript, presents a premature stop leading to a 274 amino acid long product, while the other encodes for a full length protein of 347 residues. RT-PCR demonstrated that this latter transcript is the prevalently expressed in all tissues and developmental stages. The protein has 70% id. with human TGDS and 50% id. with the recently characterized UGD from *Trichomonas vaginalis*, which catalyzes the dehydration of UDP-glucose (4).

The longer protein isoform expressed in *E. coli* exhibited the expected dehydratase activity, specific for UDP-glucose as substrate; no catalytic activity was observed on UDP-glucuronic acid, thus excluding a direct role on UDP-xylose production. The variant zebrafish proteins obtained by site-directed mutagenesis of the amino acids corresponding to the mutations in CMS patients showed reduced catalytic activity and stability, thus confirming their identification as damaging. Alpha-fold2 modeling of Tgds structure revealed the role of these residues in protein folding or interaction with the NAD⁺ coenzyme.

RT-qPCR demonstrated the highest expression levels during the initial stages of development; in adult tissues, high levels of transcript were found in ovary and lower expression in brain and eye. These preliminary results pose the basis for the development of a zebrafish knock-out model to study the morphological, molecular and biochemical alterations induced by the gene loss and to identify Tgds functional role in vertebrates.

La sindrome di Catel-Manzke (CMS) è una malattia autosomica recessiva molto rara; il gene coinvolto è TGDS, situato sul cromosoma 13. La sintomatologia è caratterizzata dalla cosiddetta "sequenza di Pierre-Robin": i pazienti presentano una mandibola molto piccola, palatoschisi e la tendenza della lingua ad occludere le vie aeree e digestive. Queste malformazioni creano i problemi principali ai pazienti, soprattutto nel periodo neonatale, per difficoltà nella respirazione e nella deglutizione. Un'altra caratteristica è la presenza di una falange aggiuntiva a carico del dito indice, che porta ad una caratteristica deviazione del dito (clinodattilia). Altre malformazioni sono state osservate a livello cardiaco, articolare e di altre regioni dello scheletro. Spesso è associato un ritardo nella crescita.

La funzione del gene TGDS nell'uomo non è al momento nota. La proteina umana presenta una identità di sequenza molto significativa con enzimi batterici e di protozoi patogeni che sono coinvolti nella produzione del L-ramnosio; tuttavia, la produzione di questo zucchero non è mai stata evidenziata nell'uomo. Comunque, l'omologia della sequenza amminoacidica e le caratteristiche cliniche dei pazienti hanno portato a proporre che TGDS possa essere coinvolta nella produzione dei proteoglicani, molecole che contengono zuccheri complessi e che svolgono un ruolo fondamentale nel corretto sviluppo dell'osso e della cartilagine.

Per avere un modello in cui studiare il ruolo di TGDS durante le prime fasi dello sviluppo e comprendere come le mutazioni osservate nei pazienti possono alterare la funzionalità della proteina, abbiamo deciso di utilizzare lo zebrafish come modello sperimentale. Zebrafish presenta numerosi vantaggi: lo sviluppo è esterno e molto veloce e gli embrioni sono trasparenti, quindi possono essere visualizzati direttamente. Inoltre, le prime fasi dello sviluppo dei vertebrati sono abbastanza sovrapponibili: pertanto, da zebrafish è possibile ottenere informazioni importanti anche per i mammiferi.

La prima parte del nostro studio è stata finalizzata a caratterizzare il gene Tgds in zebrafish e l'espressione del RNA messaggero. La proteina codificata dal gene Tgds è stata quindi prodotta come proteina ricombinante e quindi ne sono state analizzate le proprietà. Sono anche stati ottenuti dei mutanti che portano le stesse sostituzioni amminoacidiche osservate nei pazienti, per cercare di capire l'effetto delle mutazioni sulla funzionalità della proteina. La proteina Tgds wild-type ha dimostrato un'attività enzimatica sul substrato UDP-glucosio; questa attività è risultata molto ridotta nei mutanti, confermando che le mutazioni osservate nei pazienti danneggiano la proteina in modo importante.

Questi risultati ci hanno fornito le informazioni fondamentali per poter proseguire nella creazione del modello sperimentale, che verrà sviluppato attraverso l'inattivazione del gene Tgds mediante editing genetico con la tecnica CRISPR-Cas9.

Disease Name:

Catel-Manzke Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Catel-Manzke

Project number:

GMR22T1065

122. CONNECTING CRANIOFACIAL MALFORMATIONS WITH NEURAL CREST SPLICING DEFECTS BY UNCOVERING THE HIDDEN ROLE OF NATURAL KILLER CELL TRIGGERING RECEPTOR GENE (NKTR).

Oleari R.^[1], Corsinovi D.^[2], Caramello A.^[3], Paganoni A.J.J.^[1], Amoruso F.^[1], Ori M.^[2], Cariboni A.^{*[1]}

^[1]University of Milan - Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences ~ Milan ~ Italy, ^[2]University of Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[3]Imperial College London ~ London ~ United Kingdom

By analysing the exomes of two siblings affected by an unusual syndrome characterised by global developmental delay, microcephaly, craniofacial and genital malformations, we identified mutations in the Natural Killer cell Triggering Receptor (NKTR) gene. NKTR encodes for a poorly studied protein, firstly identified as membrane co-receptor for target recognition of natural killer cells (Anderson et al, 1993; Frey et al, 1991). However, its ubiquitous expression and the presence of unique domains in its protein structure suggest that NKTR might display hidden biological roles.

Specifically, the presence within NKTR structure of a cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerase domain and of a serine/arginine-rich domain suggests that NKTR could act in the nucleus as a protein controlling mRNA splicing (Rajiv & Davis, 2018). Interestingly, mutations in core components of the spliceosome have been recently found in a group of genetic syndromes known as craniofacial spliceosomopathies (Griffin & Saint-Jeannet, 2020). Affected patients exhibit symptoms similar to our probands, including microcephaly, facial dysmorphic features and global developmental delay. Since craniofacial malformations in these patients are predominantly found in neural crest cell (NCC)-derived structures of the head, it is plausible that mutations in core splicing factors lead to disrupted splicing in NCCs (Beauchamp et al, 2020). NCCs are unique group of cells that originate at the neural tube border and participate to the development of several organs including craniofacial structures (Simoes-Costa & Bronner, 2015). Thus, based on these premises and on our preliminary results described below, NKTR could be a novel gene involved in the development of NCC-derived structures and in the aetiology of this class of disorders.

Consistent with this hypothesis our preliminary observations reveal that: NKTR associates with the spliceosome, when overexpressed in cells; NKTR expression is regulated by the NCC-transcription factor SOX9 during craniofacial development in mouse and zebrafish embryos; NKTR inactivation in zebrafish induces craniofacial malformations.

For this project, we will: 1) combine expression studies in mouse embryos with luciferase assays to prove NKTR regulation by SOX9; 2) evaluate the functional contribution of NKTR to splicing assembly; 3) reveal the effects of identified NKTR mutation on protein stability, cartilage formation and NC differentiation/mRNA splicing using established in vitro and in vivo models and by leveraging transcriptome-wide analyses in NCC models. We anticipate that this project will shed light into the pathogenesis of a rare hitherto uncharacterised genetic syndrome.

Identificazione del ruolo funzionale di NKTR durante i processi di splicing dell'mRNA nelle cellule della cresta neurale per comprendere l'eziologia di una nuova neurocristopatia.

Analizzando il genoma di pazienti con una sindrome caratterizzata principalmente da malformazioni craniofacciali, abbiamo identificato mutazioni nel gene Natural Killer cell Triggering Receptor (NKTR). Il ruolo di NKTR durante i processi cellulari e di sviluppo è ancora poco conosciuto. Tuttavia, la presenza nella sua struttura di un dominio coinvolto nello splicing dell'RNA messaggero e l'esistenza di sindromi simili causate da difetti di splicing nelle cellule della cresta neurale suggeriscono che NKTR possa essere un nuovo gene implicato in questa classe di sindromi. Le cellule delle creste neurali sono un particolare gruppo di cellule che originano ai bordi del tubo neurale e partecipano allo sviluppo di diversi organi, comprese le strutture della faccia. I nostri esperimenti preliminari hanno messo in evidenza che: NKTR localizza nel nucleo, in

associazione con lo spliceosoma, quando over-espresso in modelli cellulari; l'espressione di NKTR è regolata dal fattore di trascrizione SOX9 durante lo sviluppo craniofacciale in embrioni di topo e pesce zebra; l'inattivazione di NKTR nel pesce zebra causa difetti nella formazione delle cartilagini della faccia. Sulla base di queste premesse, proponiamo di eseguire analisi più approfondite volte a valutare il ruolo biologico di NKTR durante i processi di splicing e lo sviluppo craniofacciale. Inoltre utilizzeremo modelli sperimentali ad hoc, come cellule umane staminali pluripotenti indotte per studiare la mutazione identificata e fare luce sulla patogenesi di questa famiglia di malattie genetiche rare dovute a difetti di splicing nelle cellule della cresta neurale.

Disease Name:

Developmental delay with craniofacial and genital anomalies

Nome malattia:

Sindrome caratterizzata da ritardo dello sviluppo, anomalie craniofacciali e genitali

Project number:

GMR22T1054

123. JOUBERT SYNDROME: BEYOND CONVENTIONAL MENDELIAN GENETICS

D'Abrusco F.*, Serpieri V., Pollara L., Mazzotta C., Giorgio E., Sottile V., Bianca L., De Gregorio E., Stellato T., Marando V.A., Mortarini G., Taccagni C.M., Tondinelli S., Valente E.M.

Department of Molecular Medicine, University of Pavia ~ Pavia ~ Italy

Joubert syndrome (JS) is a mostly recessively inherited rare ciliopathy diagnosed by the presence of a unique mid-hindbrain malformation, the “molar tooth sign”. Besides the typical neurological signs, JS patients present wide clinical variability, with possible involvement of other organs[1]. Over 40 JS-causative genes are identified and a definite genetic diagnosis is reached only in 60-70% cases. Genotype-phenotype correlations are established only for few genes, and it is still unclear why causative variants in some genes associate to a wide spectrum of phenotypes[2].

This project aims to:

1. Increase the diagnostic yield of JS by searching for cryptic variants in known genes.
2. Improve genotype-phenotype correlates by assessing the pathogenic impact of missense variants (especially “variants of unknown significance”).
3. Understand mechanisms underlying the variable phenotypic expression of JS genes by modeling tissue-specific phenotypes in patients’ iPSCs.

Aim 1:

We focused on 39 JS patients carrying a single coding pathogenic variant in a known JS gene. We reanalyzed NGS data searching for CNVs and rare intronic variants predicted to impact splicing, identifying 5 intragenic heterozygous deletions in 7 cases and 7 intronic variants predicted to affect splicing in 9. All intronic variants were shown to induce overt splicing defects. To date, this reanalysis detected the “second hit” in 16 patients carrying heterozygous coding variants, demonstrating that cryptic variants are common mutational events in JS.

Aim 2:

Using patients’ primary fibroblasts carrying selected variants and KO cell models in which the variant of interest was re-expressed, we assessed cellular phenotypes such as number and morphology of primary cilium, and cilia-related signaling pathways (Shh and Wnt). Upon optimization of the methods, we are currently characterizing the ciliary phenotype from 2 patients’ cell lines for each of the 7 major JS genes (CPLANE1, TMEM67, SUFU, KIAA0586, CC2D2A, RPGRIP1L, INPP5E). Meanwhile, the same genes were knocked-out in hTERT-RPE1 cell lines through stable expression of Cas9 and transient transfection of gene-specific sgRNAs; site-

directed mutagenesis to insert missense variants in WT plasmids is underway.

Aim 3:

Focusing on CPLANE1, a commonly mutated JS gene which can result in a pure neurological or in a distinctive oral-facial-digital phenotype, we established and characterized iPSCs from 2 CPLANE1 patients and 2 healthy controls. Analysis of cilia number and morphology in patients' cells indicated impaired ciliogenesis. A protocol developing 3D cerebellar organoids from iPSCs was successfully set up to monitor time-related expression of markers of cerebellar development. Comparative analysis of stage-specific neuronal markers in control and CPLANE1 cells is underway using immunofluorescence and qRT-PCR. Design of a 3D mesodermal differentiation protocol is also ongoing to study tissue-specific modulation of CPLANE1 expression.

La sindrome di Joubert: oltre la genetica mendeliana convenzionale.

La sindrome di Joubert (SJ) è una ciliopatia ereditata per lo più in modo recessivo, diagnosticata da una malformazione del mesencefalo, il "segno del dente molare". Oltre ai tipici segni neurologici, i pazienti presentano un'ampia variabilità clinica, con coinvolgimento di altri organi[1]. Sono stati identificati oltre 40 geni causativi della SJ e la diagnosi genetica definitiva viene raggiunta solo nel 60-70% dei casi. Le correlazioni genotipo-fenotipo sono state stabilite solo per pochi geni e non è ancora chiaro perché le varianti causative in alcuni geni si associno a un ampio spettro di fenotipi[2].

Ci proponiamo di:

1. Aumentare la resa diagnostica della SJ attraverso la ricerca di varianti criptiche in geni noti.
2. Migliorare le correlazioni genotipo-fenotipo valutando l'impatto delle varianti missenso.
3. Comprendere i meccanismi alla base dell'espressione dei geni della SJ modellando fenotipi tessuto-specifici in iPSC di pazienti.

1:

Ci siamo concentrati su 39 pazienti con una singola variante codificante in un gene noto. Abbiamo rianalizzato i dati NGS alla ricerca di CNV e di varianti introniche predette alterare lo splicing, identificando 5 delezioni intrageniche in 7 casi e 7 varianti introniche in 9. Tutte le varianti introniche hanno dimostrato di indurre difetti di splicing. Ad oggi, questa rianalisi ha individuato il "secondo hit" in 16 pazienti portatori di varianti codificanti eterozigoti, dimostrando che le varianti criptiche sono eventi mutazionali comuni nella SJ.

2:

Utilizzando fibroblasti di pazienti portatori di varianti selezionate e modelli cellulari KO in cui la variante di interesse è stata riespressa, abbiamo valutato il numero e la morfologia del cilio primario e le vie di segnalazione correlate. Stiamo attualmente caratterizzando il fenotipo ciliare di 2 linee cellulari di pazienti per ciascuno dei 7 principali geni (CPLANE1, TMEM67, SUFU, KIAA0586, CC2D2A, RPGRIP1L, INPP5E). Nel frattempo, gli stessi geni sono stati "knocked-out" in cellule hTERT-RPE1 attraverso l'espressione stabile di Cas9 e la trasfezione transitoria di sgRNA specifici per il gene; è in corso la mutagenesi sito-specifica per inserire varianti missenso nei plasmidi WT.

3:

Concentrandoci su CPLANE1, abbiamo creato e caratterizzato iPSC da 2 pazienti CPLANE1 e 2 controlli sani. L'analisi del numero e della morfologia delle cilia nelle cellule dei pazienti ha indicato un'alterata ciliogenesi. È stato messo a punto un protocollo di sviluppo di organoidi cerebellari 3D da iPSC per monitorare l'espressione temporale dei marcatori dello sviluppo cerebellare. È in corso l'analisi comparativa dei marcatori neuronali stadio-specifici nelle cellule di controllo e in quelle CPLANE1 mediante immunofluorescenza e qRT-PCR. È in corso anche la progettazione di un protocollo di differenziamento mesodermico 3D per studiare la modulazione tessuto-specifica dell'espressione di CPLANE1.

Disease Name:

Joubert Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Joubert

Project number:

GGP20070

124. A NOVEL NEURODEVELOPMENT SYNDROME CAUSED BY RECESSIVE VARIANTS IN THE FSD1L GENE

Serpieri V.^[1], Orsi A.*^[1], Cavan S.^[1], Mazzotta C.^[1], Celli L.^[3], De Mori R.^[9], Biagini T.^[2], Romani M.^[4], Garbelli A.^[5], Smal N.^[6], Mazza T.^[10], Sabbioneda S.^[5], Bione S.^[5], Condoluci C.^[8], Weckhuysen S.^[7], Valente E.M.^[1]

^[1]Department of Molecular Medicine, University of Pavia ~ Pavia ~ Italy, ^[2]Bioinformatics Unit, Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo ~ Foggia ~ Italy, ^[3]Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome ~ Roma ~ Italy, ^[4]Eurofins Genoma Group, Molecular Genetics Laboratory ~ Roma ~ Italy, ^[5]Institute of Molecular Genetics, IGM CNR "Luigi Luca Cavalli-Sforza" ~ Pavia ~ Italy, ^[6]Applied and Translational Neurogenomics Group, VIB Centre for Molecular Neurology, VIB ~ Anversa ~ Belgium, ^[7]Applied and Translational Neurogenomics Group, VIB Centre for Molecular Neurology, VIB, Antwerp, Belgium; ~ Anversa ~ Belgium, ^[8]IRCCS San Raffaele Pisana ~ Roma ~ Italy, ^[9]Neurogenetics Unit, IRCCS Santa Lucia Foundation ~ Roma ~ Italy, ^[10]Bioinformatics Unit, Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza ~ San Giovanni Rotondo, Foggia ~ Italy

BACKGROUND: Through exome sequencing and subsequent GeneMatcher search, we identified 7 patients from 3 unrelated families carrying biallelic variants (either missense, splice or nonsense) in a novel T-dark gene, FSD1L. Patients feature a neurodevelopmental syndrome characterized by intellectual disability, spasticity, corpus callosum hypoplasia/agenesis, periventricular white matter reduction and mild hydrocephalus. FSD1L encodes a protein highly expressed in the developing and mature brain. Nothing is known about its localization and function, except that it shares 3 conserved domains (CC-COS, FnIII and B30.2/SPRY) and an intrinsically disordered region (IDR), with its paralog FSD1. Moreover, it is highly subjected to alternative splicing, with 8 isoforms annotated, of which one non-coding.

METHODS: The impact of one missense variant on splicing was evaluated on patients' RNA. Fibroblasts from three FSD1L-mutated patients and three controls were reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs). These were characterized (karyotype, stemness) and differentiated them towards neural stem cells (NSCs) and, subsequently, neurons. Control and mutant cells underwent a preliminary set of experiments, including: 1) expression profiling of each isoform along neuronal differentiation; 2) whole transcriptome studies on NSCs and neurons; 3) neuronal differentiation and migration assays.

RESULTS: The missense variant p.Leu137Val was found to activate a cryptic splice site resulting in a deletion of 37 nucleotides, with subsequent frameshift and insertion of a premature stop codon in all isoforms. No splicing defects were detected in cells carrying the missense variant p.Phe410Val. No RNA decay was triggered by the nonsense variant p.Thr418*. By quantitative RT-PCR with isoform-specific primers, FSD1L isoforms were found to be increasingly expressed along neuronal differentiation in control cells, while expression appeared largely deregulated in all three patients, especially in mature neurons. RNAseq analysis showed a consistent, massive downregulation of several genes encoding transcription factors implicated in embryonic development, as well as members of signaling pathways (e.g. Wnt, TGFβ) and proteins implicated in neuronal migration and axon guidance. Mutant neurospheres were smaller and prone to disaggregation, and premature neurons showed markedly reduced migration ability compared to controls. Finally, when differentiating NSCs towards neurons, mutant cells showed impaired differentiation and significantly increased apoptotic death.

CONCLUSION: Our preliminary work confirms that recessive mutations in FSD1L cause a novel neurodevelopmental syndrome. FSD1L seems to play a key role in controlling neuronal migration and differentiation and in regulating transcription of key embryonic developmental pathways. The molecular mechanisms leading to such cellular phenotypes are currently being investigated.

BACKGROUND: Attraverso il sequenziamento dell'esoma, abbiamo identificato 7 pazienti di 3 famiglie non imparentate portatori di varianti bialleliche (missenso, splicing o nonsense) nel nuovo gene, FSD1L. I pazienti presentano una sindrome del neurosviluppo caratterizzata da disabilità intellettiva, spasticità, ipoplasia/agenesia del corpo calloso, riduzione della sostanza bianca periventricolare e lieve idrocefalo. FSD1L codifica per una proteina altamente espressa nel cervello e condivide con il suo paralogo FSD1 3 domini conservati (CC-COS, FnIII e B30.2/SPRY) e una regione intrinsecamente disordinata (IDR). È altamente soggetto a splicing alternativo, con 8 isoforme annotate, di cui una non codificante.

METODI: L'impatto di una variante missenso sullo splicing è stato valutato sull'RNA dei pazienti. I fibroblasti di tre pazienti mutati in FSD1L e di tre controlli sono stati riprogrammati in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), differenziate in cellule staminali neurali (NSC), poi in neuroni. Queste cellule sono state sottoposte a una serie di esperimenti preliminari: 1) profilo di espressione di ciascuna isoforma lungo il differenziamento neuronale; 2) studi sull'intero trascrittoma di NSC e neuroni; 3) saggi di differenziazione e migrazione neuronale.

RISULTATI: La variante missenso p.Leu137Val è risultata attivare un sito di splicing criptico che determina una delezione di 37 nucleotidi, con conseguente frameshift e inserimento di un codone di stop prematuro in tutte le isoforme. Non sono stati rilevati difetti di splicing nelle cellule portatrici della variante missenso p.Phe410Val. La variante nonsense p.Thr418* non ha innescato alcun decadimento dell'RNA. Mediante RT-PCR quantitativa con primer specifici, le isoforme FSD1L sono risultate sempre più espresse durante la differenziazione neuronale nelle cellule di controllo, mentre l'espressione è apparsa deregolata nei pazienti, soprattutto nei neuroni maturi. L'analisi RNAseq ha mostrato una consistente downregolazione di diversi geni codificanti per fattori di trascrizione implicati nello sviluppo embrionale, nonché membri di vie di segnalazione, come Wnt e TGFβ, e proteine implicate nella migrazione neuronale e nella guida degli assoni. Le neurosfere mutanti erano più piccole e disaggregate e i neuroni prematuri mostravano una capacità di migrazione ridotta rispetto ai controlli. Infine, durante la differenziazione delle NSC verso i neuroni, le cellule mutanti hanno mostrato una differenziazione compromessa e un aumento significativo della morte apoptotica.

CONCLUSIONE: il nostro lavoro preliminare conferma che le mutazioni recessive in FSD1L causano una nuova sindrome del neurosviluppo. FSD1L sembra svolgere un ruolo chiave nel controllo della migrazione e della differenziazione neuronale e nella regolazione della trascrizione di percorsi chiave dello sviluppo embrionale. I meccanismi molecolari che portano a questi fenotipi cellulari sono attualmente in fase di studio.

Disease Name:

Neurodevelopmental disorders

Nome malattia:

Difetti del neurosviluppo

Project number:

GJC21046

125. CRISPR-CAS9-BASED FUNCTIONAL INVESTIGATION OF THE “DARK GENOME” IN SEARCH OF PUTATIVE DOWNSTREAM EFFECTORS OF SOX2 IN NEURODEVELOPMENTAL DISEASE

Pozzolini G.^[1], Baldi R.^[1], Marengo C.^[1], Barilà S.E.^[1], Mercurio S.^[1], Testa G.^[2], Pavesi G.^[3], Esk P.C.^[4], Krenn V.^[1], Nicolis S.K.*^[1]

^[1]Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca ~ Milano ~ Italy, ^[2]Neurogenomics Research Centre, Human Technopole, Milano ~ Milano ~ Italy, ^[3]Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, ^[4]Institute of Molecular Biology, University of Innsbruck ~ Innsbruck ~ Austria

Mutation of the Sox2 gene causes defective development of multiple brain regions, leading to blindness, mental retardation, seizures. SOX2, a transcription factor, controls the activity of many genes, some of which are known to be involved, if mutated, in other neurodevelopmental defects. Understanding the molecular mechanisms of the brain defects is critical for attempts to develop novel therapies; it requires the knowledge of the roles of the genes controlled by SOX2. More broadly, identifying genes important for neural cells proliferation and for neuronal function in general would be important for understanding also other neurodevelopmental disorders, due to genes unrelated to SOX2, but involved in shared aspects of brain developmental programs.

We identified over a thousand genes controlled by SOX2 by studies in neural cells cultured from neonatal mouse brain (ref. 1). Many human genes are homologous (roughly speaking, are the human version) to the mouse genes we identified. Many of them belong to the T-dark gene category, genes of which very little is known, which represents the focus of this Call. We chose 129 human T-dark genes, prioritizing those whose activity is more impaired in mouse neural cells in which the SOX2 gene has been eliminated. We assume that the reduced expression of these genes is likely to affect important neural cells functions. To identify those genes which have roles in neurodevelopment, we will use a screening procedure, that was recently developed to identify gene defects leading to microcephaly in humans, and that is based on growing in vitro human brain “organoids” derived from a previously established cell line. The screening is based on in vitro mutagenesis via the CRISPRCas9 recent methodology, and identifies the mutated genes by genomic sequencing. This technique previously identified the mutation, in microcephaly, of a gene whose activity can be rescued towards normality by an available pharmacological agent (ref. 2).

Uno screening con tecnologia CRISPR-Cas9 in organoidi cerebrali umani per identificare nuovi geni “T-dark” effettori di Sox2 nella patologia di sviluppo neurale

La mutazione del gene SOX2 provoca difetti di sviluppo di più regioni cerebrali, e causa cecità, ritardo mentale, epilessia. SOX2, un fattore trascrizionale, controlla l'attività di molti geni, alcuni già noti per essere coinvolti, se mutati, in altri difetti del neurosviluppo. Comprendere i meccanismi molecolari dei difetti cerebrali è critico per tentare di sviluppare nuove terapie; ciò richiede la comprensione dei ruoli dei geni controllati da SOX2. In senso lato, identificare geni importanti per la proliferazione delle cellule neurali e la funzione dei neuroni sarà importante anche per comprendere altre malattie del neurosviluppo, dovute a geni diversi da SOX2, ma coinvolti in aspetti condivisi dei programmi di sviluppo cerebrali.

Abbiamo identificato oltre mille geni controllati da SOX2 studiando cellule staminali neurali coltivate dal cervello di topo neonato (ref. 1). Molti geni umani sono omologhi (in parole povere, sono la versione umana) di geni di topo da noi identificati. Molti appartengono alla categoria dei geni T-dark, dei quali poco è noto, che rappresenta il fuoco di questo bando. Abbiamo scelto 129 geni umani T-dark, dando priorità a quelli la cui attività è più ridotta in cellule neurali di topo prive del gene Sox2. Assumiamo che la ridotta attività di questi geni influenzi funzioni importanti delle cellule neurali. Per identificare geni critici per il neurosviluppo, useremo una procedura di screening, recentemente sviluppata per identificare difetti genetici che causano microcefalia nell'uomo, e basata sulla crescita in vitro di “organoidi” cerebrali umani, derivati da una linea cellulare già

stabilità. Lo screening usa la recente tecnologia CRISPR-Cas9 per creare mutazioni in vitro negli organoidi, e identifica i geni mutati mediante sequenziamento genomico. Questa tecnica ha già identificato la mutazione, nella microcefalia, di un gene la cui attività può essere riportata verso la norma mediante un farmaco già esistente (ref. 2).

Disease Name:

Neurodevelopmental disorders

Nome malattia:

Difetti del neurosviluppo

Project number:

GJC21176

126. GENERATION OF PATIENT-DERIVED IPSCS FOR UNDERSTANDING THE PATHOGENIC MECHANISMS UNDERLYING ALTERED NEURONAL FUNCTION ASSOCIATED WITH CAMK2B GENE MUTATIONS

Borghi R.*, Trivisano M., Specchio N., Tartaglia M., Compagnucci C.

Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS ~ Roma ~ Italy

Patients with neuro-developmental syndrome due to CAMK2b gene mutation present global developmental delay, intellectual disability, hypotonia, abnormality of the brain morphology, seizures, autism spectrum disorder, sleep disturbance and behavioral abnormalities (Kury et. al., 2017). Unfortunately, CAMK2B patients cannot benefit on an efficacious therapeutic approach and, for this reason, further studies are compulsory. The present study aimed to develop a human cellular model using patient-derived cells able to recapitulate in vitro neurogenesis and neuronal functionality. In particular, we obtained skin fibroblast from a patient carrying the de novo missense variant c.416C>T (p.Pro139Leu) in CAMK2B gene. Patient's fibroblasts have been successfully reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) using a non-integrating episomal methodology. Additionally, we have assessed their pluripotency by positivity to alkaline phosphatase and pluripotency markers (i.e. OCT4, SOX2, SSEA4 and TRA1-60). The obtained patient-derived iPSCs will be used to generate cortical neurons and live-imaging readouts to assess the morphological (i.e. neurites' length) and functional features (i.e. calcium imaging assays) of patient-derived neurons will be performed. The data obtained from this study will help to characterize the pathophysiology of this rare genetic disease.

Generazione di iPSC derivate da paziente per comprendere i meccanismi patogenici alla base della funzione neuronale alterata associata a mutazioni del gene CAMK2b

Il presente studio ha consentito di generare un modello umano di studio per la "sindrome del neuro-sviluppo dovuta alla mutazione del gene CAMK2b" con l'obiettivo di svelarne i meccanismi patogenetici e produrre una conoscenza in grado di portare a nuove ipotesi per l'avanzamento di approcci terapeutici mirati ed efficaci. Il modello sviluppato consiste in cellule staminali pluripotenti indotte (denominate iPSC) riprogrammate da fibroblasti ottenuti da biopsia cutanea di un paziente con la variante c.416C>T (p.Pro139Leu) nel gene CAMK2B. Le cellule ottenute sono state validate per sterilità, capacità proliferativa, positività a marcatori di pluripotenza e caratterizzate per la loro capacità di differenziare in molteplici tipi cellulari (i.e. cellule neuronali). Tali cellule saranno differenziate in neuroni corticali per studiare le caratteristiche morfologiche e funzionali durante e dopo il differenziamento neuronale e confrontate con neuroni derivati da iPSC derivate da individui sani. Il modello generato aiuterà a chiarire i meccanismi patogenetici che causano i difetti

neuronal osservati nei pazienti. I dati ottenuti faranno luce sul fenotipo alterato nei neuroni derivati dal paziente e questo è il primo passo verso la comprensione dei meccanismi responsabili della malattia e verso la generazione di ipotesi per recuperare il fenotipo alterato e considerare la sperimentazione di diversi approcci terapeutici.

Disease Name:

Neurodevelopmental syndrome due to CAMK2b mutation

Nome malattia:

Sindrome del neurosviluppo dovuta a mutazioni del gene CAMK2B

Project number:

GSA22G003

127. ALTERED CORTICAL SENSORY PROCESSING AND FUNCTIONAL CONNECTIVITY IN SHANK3B+/- MICE

Montagni E.^[1], Martello A.^[2], Pavone F.S.^[3], Allegra Mascaro A.L.^[4]

^[1]European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy ~ Sesto Fiorentino ~ Italy, ^[2]Physics and Astronomy Department, University of Florence ~ Sesto Fiorentino ~ Italy, ^[3]National Institute of Optics, National Research Council ~ Sesto Fiorentino ~ Italy, ^[4]Neuroscience Institute, National Research Council ~ Pisa ~ Italy

Atypical sensory processing is a proposed etiological factor underlying the development of behavioral deficits in autism spectrum disorder (ASD). Patients with Phelan-McDermid Syndrome (PMS) often show somatosensory processing dysfunction, including altered sensitivity to touch and tactile defensiveness [1]. Mice mutants of the Shank3 gene are generally considered a reliable model for studying ASD-like symptoms relevant to PMS [2]. Specifically, Shank3B mutant mice display aberrant whisker-independent texture discrimination and reactivity to tactile stimuli [3]. While behavioral deficits have been extensively described, the neural substrates of tactile sensory processing deficits in PMS are still poorly understood.

We posited that 1) the cortical somatosensory response is affected in Shank3 haploinsufficient (Shank3B+/-) mice and contributes to the altered responsiveness of the behavioral phenotype; 2) focal inhibition of cortical activity can modulate the sensitivity to peripheral stimulation in Shank3B+/- mice.

Preliminary results show that the spatiotemporal features of the sensory-evoked cortical response are substantially different in Shank3B+/- compared to wild type mice at post-natal day 60. Alterations of the sensory-evoked response involve most cortical regions including the barrel field and associative areas like the retrosplenial cortex. Specifically, the secondary response to the stimulus is the most affected, leading to a stronger and widespread late activation. Since the secondary response is associated with the perception of sensory stimuli, this aberrant and enduring activation suggests that perception of the stimulus is altered (and likely longer lasting) in Shank3B+/- mice. Finally, results show that the aberrant processing of sensory stimuli leads to modifications on the functional connectivity (FC) of the barrel field with many other regions. Interestingly, the FC differences between mutated and wild type mice are brain-state dependent, i.e. strong in wakefulness and absent in deeper anesthesia.

We previously demonstrated the therapeutic potential of optogenetic stimulation in a mouse model of brain injury [4]. Therefore, in the next step, we will alter the sensory discrimination capacities of Shank3B+/- mice by employing optogenetic cortical inhibition of excitatory neurons to re-establish

physiological functionality. To this aim, we successfully set the double cortical labeling with a calcium indicator and an optogenetic actuator mediated by AAV transfection and performed simultaneous imaging and optogenetic stimulation [5]. Short- and long-term changes in sensory responsiveness will be validated by monitoring the behavioral phenotype and by imaging the cortical sensory response.

Alterata elaborazione corticale degli stimoli sensoriali e connettività funzionale atipica in topi SHANK3B+/-

L'alterata elaborazione sensoriale è uno dei fattori contribuenti allo sviluppo di deficit comportamentali nel disturbo dello spettro autistico (ASD). I pazienti con la sindrome di Phelan-McDermid (PMS) spesso mostrano disfunzioni nell'elaborazione somato-sensoriale, come un'alterata sensibilità e difesa tattile [1]. I topi che presentano mutazione del gene Shank3 sono considerati un modello affidabile per lo studio di quei sintomi della PMS simili all'ASD [2]. In particolare, i topi Shank3B mutati mostrano un'alterata capacità di discriminare trame a grana differenti e una reattività agli stimoli tattili [3]. Sebbene i deficit comportamentali siano stati ampiamente investigati, le basi neurali sottostanti l'alterata elaborazione sensoriale nella PMS sono ancora poco conosciuti.

Abbiamo ipotizzato che 1) l'alterata risposta corticale nei topi aploinsufficienti Shank3 (Shank3B+/-) contribuisca alla reattività anomala a livello comportamentale; 2) l'inibizione locale dell'attività corticale può modulare la sensibilità agli stimoli periferici in topi Shank3B+/-.

I nostri risultati preliminari mostrano che, 60 giorni dopo la nascita, la risposta corticale evocata sensorialmente ha caratteristiche spaziotemporali diverse nei topi Shank3B+/- rispetto ai topi di controllo. Queste alterazioni coinvolgono molte regioni corticali tra cui la corteccia sensoriale del baffo e le aree associative. Nello specifico, è presente un'attivazione tardiva più forte e diffusa nei topi Shank3B+/- che evidenzia una risposta secondaria allo stimolo differente tra i due gruppi. Poiché la risposta secondaria è normalmente associata alla percezione degli stimoli sensoriali, questa attivazione aberrante e duratura ne suggerisce un'alterazione nei topi Shank3B+/. I nostri risultati mostrano inoltre che l'anomala elaborazione degli stimoli sensoriali induce alterazioni della connettività funzionale (FC) della corteccia sensoriale del baffo con molte altre regioni corticali. Queste differenze dipendono fortemente dallo stato cerebrale: sono forti nella veglia e assenti in anestesia profonda.

Grazie a studi precedenti abbiamo dimostrato il potenziale terapeutico della stimolazione optogenetica in un modello murino di lesione cerebrale [4]. Uno dei prossimi obiettivi è manipolare le capacità di discriminazione sensoriale dei topi Shank3B+/- tramite inibizione optogenetica dei soli neuroni eccitatori, di modo da ristabilire una funzionalità fisiologica. A tal fine, abbiamo sviluppato una tecnica di doppia trasfezione corticale (indicatore calcio e attuttore optogenetico) mediante utilizzo di AAV che permetta imaging e stimolazione optogenetica in simultanea [5]. I cambiamenti a breve e lungo termine nella risposta sensoriale saranno valutati monitorando il comportamento e analizzando la risposta corticale a seguito di stimolazione periferica.

Disease Name:

Phelan-McDermid Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Phelan-McDermid

Project number:

GSA22E006

128. MODELING PITT-HOPKINS SYNDROME AND NEW PATHOGENETIC VARIANTS OF TCF4 BY GENE EDITING: A STEP FORWARD TOWARD PRECISION MEDICINE (HOPEFOR)

Orefice M.^{*[1]}, Salamone G.^[1], Savoli S.^[1], De Sarlo M.^[1], Vitobello A.^[2], Ori M.^[1]

^[1]Università di Pisa, Dipartimento di Biologia ~ Pisa ~ Italy, ^[2]MCU-PH at University of Burgundy - Centre Hospitalier Universitaire de Dijon ~ Dijone ~ France

TCF4 loss-of-function variants cause Pitt-Hopkins syndrome (PTHS, OMIN 610954), a rare disease associating intellectual disability (ID), wide mouth, distinctive facial features, and intermittent hyperventilation followed by apnea. Pathogenic missense variants are primarily clustered within the bHLH domain required for dimerization and DNA binding. Using exome sequencing, Prof. Antonio Vitobello, identified de novo missense variants in TCF4 in three individuals who did not show typical PTHS hallmarks. The variants affect ultra-conserved amino acids within the bHLH domain. Preliminary data on patients' samples suggested that TCF4 novel variants could induce a gain of function phenotype suggesting a novel molecular pathogenetic mechanism. These individuals show consistent phenotypic features associating cranio-facial dysmorphism, limb anomalies and growth failure without ID. The first goal of our project is to functionally study the three de novo variants of TCF4 in vivo. The second goal is to generate, by CRISPR/Cas9n approach, zebrafish lines representing new in vivo models for the PTHS and the novel TCF4 Met/Lys variant, to find and validate new TCF4 targets and to provide the scientific community in vivo platforms for drug screening. Due to the complexity of neurodevelopmental genetic disorders the use of animal models is still required. On the other hand, the experimentation with animals could be costly, time consuming and could raise ethical concerns. We design a project aimed to solve these limitations without affecting efficiency and efficacy. The use of a non-mammalian species reduces the ethical impact of the project following the international guidelines on the 3R principles.

We will also generate a PTHS model reproducing the Arg576Trp mutation in zebrafish known to be associated with a loss of function phenotype in patients. In case of success, we will provide new zebrafish lines phenocopy the human patient's condition generating their "avatars" for drug testing in the perspective of precision medicine. Contingency plan: In case the CRISPR/Cas9nickase gene editing approach will not work, we can identify TCF4 and TCF4 variants target genes by comparing transcriptome profile of the patients' fibroblasts to that of zebrafish brain and craniofacial tissues overexpressing TCF4 or TCF4 variants. To model PTHS, as contingency plan, we have two possibilities: 1) to overexpress the Arg576Trp TCF4 mRNA in zebrafish embryos to test a dominant negative effect in combination with a tcf4 splicing morpholino to downregulate the endogenous gene; 2) further characterize a tcf4 zebrafish knock out line that we recently obtained in the lab presenting a 13 nucleotides deletion with the formation of premature stop codon into the exon coding for the tcf4 bHLH domain. This project can also represent a proof of concept to develop new strategies for other rare diseases. From bed to fish tank and back!

L'avvento delle nuove tecnologie CRISPR/Cas9 ci permette oggi di generare nuovi modelli per lo studio delle patologie genetiche rare. Nel nostro progetto proponiamo di riprodurre nel pesciolino zebrafish mutazioni specifiche identificate nel gene TCF4 in pazienti affetti da Sindrome di Pitt-Hopkins e in tre bambini in studio con nuove mutazioni mai descritte. A causa della complessità dei disordini genetici dello sviluppo l'uso di modelli animali è ancora necessario per studiare gli effetti di specifiche mutazioni nell'intero organismo e saggiare la possibile tossicità e/o efficacia di nuovi trattamenti. Il nostro progetto tiene in considerazione le problematiche etiche legate a questi aspetti utilizzando un pesciolino come modello ricucendo così la sperimentazione sui mammiferi riservandola alle fasi precliniche più avanzate. Le larve di zebrafish porteranno la stessa mutazione dei pazienti in studio e saranno il loro "avatar acquatico" su cui saggiare nuovi trattamenti che speriamo siano suggeriti dalla nostra ricerca. Il progetto contribuirà inoltre a

studiare aspetti ancora non conosciuti della patologia e del ruolo del gene TCF4. Il progetto ha come punto di forza il forte legame tra ricerca di base e applicata. Consapevoli della grande sfida alla base dei progetti sulle malattie rare riteniamo che la nostra proposta produrrà conoscenze e risultati in grado di accelerare l'identificazione di nuovi interventi terapeutici per i pazienti Pitt-Hopkins e con nuove mutazioni nel gene TCF4 nell'ottica della medicina personalizzata e rappresentare un esempio di nuovo approccio comparativo e integrato uomo/pesce per sviluppare nuove strategie anche per altre malattie rare.

Disease Name:

Pitt-Hopkins Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Pitt-Hopkins

Project number:

GMR22T1071

129. THE ROLE OF ANCIENT GENE VARIANTS IN PRADER-WILLI SYNDROME PATHOPHYSIOLOGY

Polito A.*^[2], Serani A.^[1], Tsushima H.^[1], Tucci V.^[1]

^[1]Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy, ^[2]Padova Neuroscience Center (PNC), University of Padova ~ Padova ~ Italy

Prader-Willi Syndrome (PWS) is a neurodevelopmental disorder caused by genetic defects within a locus on chromosome 15 (15q11-q13), in which the loss of expression of paternally inherited genes (PEGs) causes severe symptoms, including neurodevelopmental delays, hyperphagia, and obesity, as well as various disturbances in the rhythms of sleep and wakefulness. In particular, Obesity in PWS is associated with feeding behavior anomalies and an imbalance between adipose and lean tissue in favor of increased adiposity. We have identified a novel mechanism involved in the nuclear pore functions, which promises to reveal how the cellular mechanisms in Prader-Willi Syndrome (PWS) might lead to obesity. Particularly, within the human PWS locus, we focused on the role of the human specific nuclear pore complex-associated protein 1 (NPAP1).

We conducted a genomic analysis for positive selection by comparing genomes of non-human primates and ancient and modern humans. Our analysis revealed SNPs variants of the NPAP1 gene between modern humans (derived alleles) and the orthologous sequence of the Neanderthal and Chimpanzee (ancestral allele). We identify three different NPAP1 haplotypes: the high frequent variants WET, the completely derived WQT, and the ancestral REP variant with negligible frequency in the human population. Our preliminary analysis revealed that serum-starved fibroblast-derived adipocytes obtained from the Snord116m+/p- PWS mouse model overexpressing the WET haplotype increased lipid accumulation compared to the control and the other two NPAP1 haplotypes. Moreover, the overexpression of WET NPAP1 in synchronized fibroblast from Snord116m+/p- mice showed disruption in the oscillation of some circadian genes such as Dbp and Per2.

As suggested from 3D modeling, the conformational changes of the WET protein may be determinants for altered dynamics in lipid accumulation and circadian homeostasis. We hypothesize that the obesity phenotype of PWS patients results from altered cross-regulation between SNORD116 and WET NPAP1 haplotype anomalously expressed from the maternal allele. To reveal the mechanisms of lipid accumulation and the circadian regulation driven by the SNORD116-NPAP1 relationship, we are analyzing the effect of SNORD116 on NPAP1 mRNA, protein, and molecular complexes in vitro. Furthermore, we generated a novel, humanized, mouse

model encoding NPAP1 in the orthologous region of the PWS mouse locus. The analysis of the mouse phenotype is currently ongoing in our lab in the areas of metabolism, including feeding and energy homeostasis, and measurements of metabolic and circadian phenotypes. This mouse model will be instrumental in designing a treatment strategy based on our novel developed target-specific epigenetic writer to suppress NPAP1 on the maternal allele.

Studio di varianti genetiche ancestrali coinvolte nella malattia di Prader-Willi

La sindrome di Prader-Willi (PWS) è una malattia genetica rara dello sviluppo causata da delezione del locus 15q11-q13 trasmessa dal padre, da una disomia materna o, molto raramente, da difetti dell'imprinting nella stessa regione. I sintomi della PWS comprendono ritardi nel neurosviluppo, iperfagia e obesità, nonché alterazioni del ritmo sonno-veglia. In particolare, l'obesità è associata a una alterazione dei comportamenti che coinvolgono l'alimentazione e un arcato aumento del tessuto adiposo. Recentemente, il nostro laboratorio ha identificato un nuovo meccanismo che coinvolge la proteina associata al poro nucleare 1 (NPAP1). Il gene di questa proteina, che è presente solo nell'uomo, potrebbe essere coinvolto nella alterata regolazione dell'adipogenesi che caratterizza la PWS

Comparando il genoma dell'Homo Sapiens a quello del Neanderthal e dello scimpanzé, abbiamo identificato dei polimorfismi del gene NPAP1 che potrebbero derivare da un adattamento all'alimentazione durante le migrazioni delle popolazioni umane ancestrali e che potrebbero essere coinvolte nella sintomatologia della PWS legata all'obesità. In particolare abbiamo identificato 3 varianti: una variante ancestrale presente nel Neanderthal e nei primati non umani, una variante mista presente nel 40% della popolazione mondiale, e una variante moderna presente nel restante 60%.

In modelli di topo PWS caratterizzati dalla delezione di SNORD116, che rappresenta la delezione minima capace di manifestare la malattia, le diverse varianti di NPAP1 hanno mostrato di regolare in modo differente la capacità di accumulo lipidico delle cellule. Le nostre analisi suggeriscono che la variante moderna contribuisce a rallentare lo sviluppo delle cellule adipocitarie e rallenta l'accumulo di lipidi da parte delle cellule. Al contrario, la variante mista provoca un aumento della capacità di internalizzazione dei lipidi da parte del tessuto adiposo. Per identificare il ruolo di NPAP1 nella PWS, abbiamo generato un nuovo modello animale caratterizzato dalla presenza del gene umano nel locus omologo del genoma del topo. Questo nuovo topo verrà incrociato con i animali già utilizzati nello studio della PWS per generare un modello più efficace per lo studio di questa malattia. Inoltre, questo modello ci permetterà di investigare nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di modificatori epigenetici target-specifici recentemente sviluppati nel nostro laboratorio

Disease Name:

Prader-Willi Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Prader-Willi

Project number:

GMR22T1039

130. INVESTIGATING THE RELATIONSHIP BETWEEN TRANSCRIPTIONAL AND REPRESSIVE CONDENSATES IN A STEM CELL-BASED KABUKI SYNDROME MODEL

Negri M.L.*, D'Annunzio S., Lago S., Zippo A.

University of Trento ~ Trento ~ Italy

The haploinsufficiency of KMT2D (encoding for the histone methyltransferase MLL4) represents the underlying cause of Kabuki syndrome: a rare multi-systemic disease. MLL4 belongs to the Trithorax (TrxG) group of proteins, involved in maintaining active gene expression, which functionally antagonize Polycomb (PcG) proteins, implicated in the establishment of the repressive state.

Recently, we demonstrated that MLL4, through liquid-liquid phase separation, contributes to the assembly of transcriptional condensates, which are in equilibrium with the PcG ones. In MLL4 loss of function (MLL4 LoF) conditions, this equilibrium is perturbed: the alteration of transcriptional condensates, accompanied by decreasing level of MLL4-deposited histone marks (H3K4me1 and H3K27ac), affects the PcG repressive compartments in terms of increased H3K27me3 deposition and Polycomb repressive complex 1 (PRC1) protein clustering. Besides the transcriptional regulation function, the chromatin-associated condensates seem to be also involved in defining the biomechanical and physics function of the nucleus.

Despite such evidence, the comprehensive dynamic and relationship between chromatin-associated condensates and chromatin compartments have not yet been fully elucidated. We propose that transcriptional condensates affect the probability of repressive-associated chromatin regions being in proximity. By combining chromatin profiling with 3D chromatin organization studies, we are dissecting the mechanisms governing the interplay between chromatin condensates and compartments, at the genomic level. Furthermore, we are interested in understanding how other chromatin remodeling complexes, such as the ATP-dependent complex BAF, are differently regulated in the disease model. Overall, our study can help in understanding how chromatin can modulate the mechanical properties impacting the nuclear architecture, shedding light on this mechanism in Kabuki patients.

Qual è la relazione tra condensati trascrizionali e repressori in un modello di sindrome di Kabuki?

L'aploinsufficienza di KMT2D (gene codificante per la metil-transferasi MLL4) comporta la sindrome di Kabuki: una rara malattia genetica multi-sistemica.

MLL4 appartiene al gruppo di proteine Trithorax (TrxG), coinvolte nell'attivazione dell'espressione genica, le quali sono funzionalmente opposte a Polycomb (PcG), implicate invece nella repressione trascrizionale.

Recentemente, è stato dimostrato che MLL4, tramite un processo di separazione di fase, contribuisce alla creazione di condensati trascrizionali, i quali sono in equilibrio con i condensati Polycomb. Nello stato patologico della sindrome di Kabuki, questo equilibrio è alterato: in seguito alla riduzione di MLL4 diminuiscono i condensati trascrizionali, e le relative modifiche istoniche da esso depositate (H3K4me1 e H3K27ac); mentre, in maniera opposta, aumenta il compartimento repressorio associato a Polycomb. Inoltre, oltre alla tipica funzione di regolazione trascrizionale, i condensati hanno una funzione nel definire le proprietà biomeccaniche e fisiche del nucleo.

Nonostante queste evidenze, la complessiva relazione che avviene a livelli genomico tra condensati trascrizionali e repressori non è del tutto chiara. La nostra ipotesi è che la presenza dei condensati trascrizionali influenzi la probabilità che le regioni cromatiniche associate a PcG siano tra loro in contatto. Combinando approcci di caratterizzazione epigenetica e organizzazione 3D della cromatina, stiamo investigando quale sia il meccanismo che governa il loro rapporto

reciproco a livello genomico. Inoltre, siamo interessati a capire come altri rimodellatori della cromatina, come ad esempio il complesso ATP-dipendente BAF, siano differenzialmente regolati nel modello di sindrome di Kabuki in studio. Il nostro studio può aiutare a comprendere come questi condensati "comunichino" tra loro, e di conseguenze come la cromatina moduli l'architettura nucleare, facendo così luce su tali meccanismi nella sindrome di Kabuki.

Disease Name:

Kabuki Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Kabuki

Project number:

GGP20010

131. ROLE OF CHROMATIN CONDENSATES IN TUNING NUCLEAR MECHANOSENSING IN KABUKI SYNDROME

D'Annunzio S.*, Zippo A.

University of Trento, CIBIO ~ Trento ~ Italy

The human genome is characterized by an extent of functions that act further than its genetic role. Indeed, the genome can also affect cellular processes by nongenetic means through its physical and structural properties, specifically by exerting mechanical forces that shape nuclear morphology and architecture. The balancing between two chromatin compartments with antagonist functions, namely Transcriptional and Polycomb condensates, is required for preserving nuclear mechanical properties and its perturbation is causative of the pathogenic condition Kabuki syndrome (KS) (Fasciani et al., 2020). KS is a rare monogenic disease caused by the haploinsufficiency in the KMT2D gene encoding for MLL4, a H3K4-specific methyltransferase important for the regulation of gene expression. By interrogating the effect of KMT2D haploinsufficiency in Mesenchymal Stem Cells (MSCs) we discovered that MLL4 loss of function (LoF) impaired Polycomb-dependent chromatin compartmentalization, altering the nuclear architecture and the cell mechanoresponsiveness during differentiation (Fasciani et al., 2020). These results suggest that altered nuclear mechanics rely on chromatin architecture and could potentially lead to changes in cell responses to external mechanical stimuli. For this reason, we investigated the role of Transcriptional and Polycomb condensates in tuning nuclear responses to different external mechano-physical conditions. To affect nuclear mechanics, we employed the use of several mechanical devices (e. g. substrate stiffness, microchannels with constrictions, and cell confinement). We found that Polycomb and Transcriptional condensates are modulated by changes in substrate rigidity in healthy conditions and that MLL4 LoF impairs the MSCs nuclear condensates-driven mechanical response. Furthermore, we observed that MLL4 LoF impacts nuclear adaptation to confined spaces by incrementing susceptibility to nuclear envelope rupture and cell death. Altogether these findings suggest that MLL4 LoF impairs cell responses to external mechanical stimuli, shedding light on the pathological connection between the altered cell mechanoresponsiveness during differentiation and KS phenotype in terms of skeletal and cartilage anomalies.

Ruolo dei compartimenti cromatinici nella risposta nucleare a stimoli meccanici nella sindrome di Kabuki.

Il genoma umano è caratterizzato da un'estensione di funzioni che agiscono oltre il suo ruolo genetico. Il genoma può difatti anche influenzare i processi cellulari con mezzi non genetici

attraverso le sue proprietà fisiche e strutturali, in particolare esercitando forze meccaniche che modellano la morfologia e l'architettura nucleare. Il bilanciamento tra due compartimenti della cromatina con funzioni antagoniste, denominati condensati trascrizionali e di Polycomb, è necessario per preservare le proprietà meccaniche nucleari e la sua perturbazione è causale della sindrome di Kabuki (SK) (Fasciani et al., 2020). La SK è una rara malattia monogenica causata dall'aploinsufficienza del gene KMT2D che codifica per MLL4, una metiltransferasi specifica per H3K4 importante per la regolazione dell'espressione genica. Interrogando l'effetto dell'aploinsufficienza di KMT2D nelle cellule staminali mesenchimali (MSC), abbiamo scoperto che la perdita di funzione (LoF) di MLL4 compromette la compartimentazione della cromatina mediata da Polycomb, alterando l'architettura nucleare e la meccanoresponsività cellulare durante il differenziamento (Fasciani et al., 2020). Questi risultati suggeriscono che la meccanica nucleare dipende dall'architettura della cromatina e potrebbe potenzialmente portare a cambiamenti nelle risposte cellulari a stimoli meccanici esterni. Per questo motivo, abbiamo studiato il ruolo dei condensati trascrizionali e di Polycomb nella risposta nucleare a diverse condizioni meccanofisiche esterne. Per influenzare la meccanica nucleare, abbiamo impiegato l'uso di diversi dispositivi meccanici (ad esempio diverse rigidità del substrato, microcanali con restrizioni e confinamento cellulare). Così facendo, abbiamo osservato che i condensati di Polycomb e trascrizionali sono modulati dai cambiamenti nella rigidità del substrato in condizioni sane e che MLL4 LoF compromette la risposta meccanica guidata dai condensati nucleari delle MSC. Inoltre, abbiamo osservato che MLL4 LoF influisce sull'adattamento nucleare a spazi ristretti aumentando la suscettibilità di queste cellule alla rottura dell'involucro nucleare e alla morte cellulare. Complessivamente questi risultati suggeriscono che MLL4 LoF compromette le risposte cellulari agli stimoli meccanici esterni, facendo luce sulla connessione patologica tra la meccanoresponsività cellulare alterata durante la differenziazione e il fenotipo KS in termini di anomalie scheletriche e cartilaginee.

Disease Name:

Kabuki Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Kabuki

Project number:

GGP20010

Genetic endocrine disease

132. XQ26.3 DUPLICATIONS IN X-LINKED ACROGIGANTISM DISRUPT A TOPOLOGICALLY ASSOCIATING DOMAIN (TAD) AND REWIRE GPR101-ENHANCER INTERACTIONS

Franke M.^[2], Daly A.^[5], Grasso A.^[1], Tirosch A.^[4], Palmeira L.^[5], Eszter T.^[1], Faucz F.^[3], Abboud D.^[5], Petrossians P.^[5], Lania A.^[1], Beckers A.^[5], Stratakis C.^[3], Trivellin G.*^[1]

^[1]Humanitas University ~ Rozzano ~ Italy, ^[2]Andalusian Center for Developmental Biology (CABD) ~ Universidad Pablo de Olavide - CSIC ~ Spain, ^[3]Section on Endocrinology and Genetics, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH) ~ Bethesda ~ United States of America, ^[4]NET Service and Endocrine Oncology Bioinformatics Lab, Sheba Medical Center, Tel Aviv University ~ Ramat Gan ~ Israel, ^[5]Centre Hospitalier Universitaire de Liège, University of Liège ~ Liege ~ Belgium

X-linked acrogigantism (X-LAG) is the most severe form of pituitary gigantism and is characterized by aggressive growth hormone (GH)-producing pituitary tumors that occur in infants.¹ X-LAG is associated with chromosome Xq26.3 duplications (the X-LAG locus typically includes the VGLL1, CD40LG, ARHGEF6, RBMX, and GPR101 genes) that lead to massive pituitary tumoral expression of the G protein-coupled receptor GPR101, a novel regulator of GH secretion.² The mechanism underlying GPR101 over-expression was previously unknown.

The genome has recently been shown to be compartmentalized into discrete regulatory units termed topologically associating domains (TADs). TADs are submegabase-size chromatin domains with high levels of internal interaction that are insulated from each other by regions of low interaction (TAD borders).³ TAD insulation, therefore, favors the specificity of enhancer-promoter interactions.

Using chromosome conformation capture techniques (Hi-C and 4C-seq), we characterized the normal chromatin structure at the X-LAG locus. We showed that GPR101 is located within a TAD delineated by a tissue-invariant and evolutionary conserved border that separates it from centromeric genes and cis-regulatory elements (CREs). All duplications in X-LAG patients involve GPR101, the strong TAD border, and centromeric sequences. RNA-seq analysis in X-LAG tumors and normal pituitary showed that gene misexpression predominantly affects GPR101. Next, using 4C-seq with GPR101, RBMX, and VGLL1 viewpoints, we showed that the duplications in X-LAG patients disrupt the invariant TAD border and produce ectopic interactions that form a novel chromatin domain (neo-TAD). We identified several pituitary active CREs (six candidate enhancers and two GPR101 promoter sequences) within the neo-TAD and demonstrated that an enhancer located close to RBMX significantly enhanced reporter gene expression in cell lines. At the same time, we showed that the GPR101 promoter permits the incorporation of this new regulatory information both in pituitary and embryonic cells.

Currently, we are functionally characterizing the human enhancers using transgenic zebrafish embryos. We already cloned the CREs in a specific vector and injected embryos using a transposon-based system. The F0 founders are now being crossed to generate F1 embryos with stable transgene integration in the genome. Moreover, to identify novel pituitary CREs, we are optimizing ChIP-sequencing experiments for enhancer-associated histone marks using operated human pituitary tumors.

In conclusion, our results identify X-LAG as a new TADopathy: to our knowledge the first described in endocrinology. Xq26.3 duplications disrupt the local chromatin architecture by forming a neo-TAD and this rewiring of GPR101-enhancer interaction causes the marked over-expression of GPR101 in X-LAG tumors, which in turn drives tumoral GH hypersecretion and gigantism.

Duplicazioni del gene GPR101 associate ad acrogigantismo legato all'X alterano la struttura della cromatina e portano ad una anormale interazione tra GPR101 e specifiche sequenze regolatorie

L'acrogigantismo legato all'X (X-LAG) è la forma più grave di gigantismo ipofisario. L'X-LAG è caratterizzato da tumori ipofisari aggressivi che producono l'ormone della crescita (GH) ed insorgono durante l'infanzia. L'X-LAG è causato da duplicazioni nel cromosoma X che coinvolgono il gene GPR101, portando ad una sua alterata espressione nei tumori dei pazienti. Il meccanismo alla base della sovraespressione di GPR101 era precedentemente sconosciuto.

Recentemente è stato dimostrato che il genoma è suddiviso in specifiche unità regolatorie, ovvero domini cromatinici con alti livelli di interazione del DNA che sono isolati l'uno dall'altro da regioni a bassa interazione. I domini cromatinici, perciò, favoriscono la specificità delle interazioni tra i geni e le sequenze regolatrici della loro espressione.

Utilizzando tecniche in grado di delineare la conformazione cromatinica, abbiamo caratterizzato la normale struttura della cromatina nella regione del genoma dove è localizzato GPR101. Abbiamo dimostrato che GPR101 si trova isolato all'interno di un dominio cromatinico che lo separa dai geni vicini e da sequenze regolatorie denominate enhancer. Queste sequenze promuovono l'espressione genica, agendo come un "turbo". Successivamente, abbiamo dimostrato che le duplicazioni nei pazienti con X-LAG portano alla formazione di un nuovo dominio della cromatina. Al suo interno, abbiamo identificato sei enhancer attivi nelle cellule ipofisarie e dimostrato la funzionalità di uno di essi usando come modello sperimentale delle linee cellulari.

Attualmente, stiamo caratterizzando la funzione degli enhancer mediante la loro iniezione in embrioni di zebrafish. Ciò ci consente di capire in quali organi tali sequenze di DNA siano funzionali. Inoltre, per identificare nuovi enhancer attivi nell'ipofisi, stiamo ottimizzando degli esperimenti partendo da cromatina isolata da cellule tumorali provenienti da pazienti operati per un tumore ipofisario.

In conclusione, i nostri risultati identificano l'acrogigantismo legato all'X come una nuova patologia che altera la struttura della cromatina attorno al gene GPR101. Le duplicazioni di GPR101 interrompono l'architettura locale della cromatina portando ad una anormale interazione tra GPR101 e alcuni enhancer, provocando di conseguenza la sua marcata espressione nei tumori ipofisari. Questo evento, a sua volta, porta all'ipersecrezione tumorale di GH e al gigantismo.

Disease Name:

X-linked acrogigantism

Nome malattia:

Acrogigantismo legato all'X

Project number:

GGP20130

Genetic eye disease

133. MIR-181A/B DOWNREGULATION: A MUTATION-INDEPENDENT THERAPEUTIC APPROACH FOR INHERITED RETINAL DISEASES

Di Guida M.^[1], Petrogiannakis G.^[1], Capasso D.^[1], Brandi P.^[1], Garcia--Piqueras J.^[1], Ruiz--Ceja K.A.^[1], Negueruela S.^[1], Pizzo M.^[1], Capolongo F.^[1], Karali M.^[2], Franco B.^[1], Indrieri A.^[1], Carrella S.^[1], **Banfi S.*^[1]**

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli (NA) ~ Italy, ^[2]Medical Genetics, Department of Precision Medicine, University of Campania "Luigi Vanvitelli" ~ Naples ~ Italy

Inherited retinal diseases (IRDs) are among the most prevalent causes of vision loss/blindness of genetic origin in the working-age population. They display extensive genetic heterogeneity, which significantly limits the rapid development of gene-specific approaches that can be applied to a large fraction of patients. Due to their pervasive control of many pathophysiological processes and to their easy manipulation, microRNAs (miRNAs) may represent ideal gene/mutation-independent therapeutic tools for IRDs. Our goal is to identify miRNAs able to exert a protective action on IRD progression by modulating pathways involved in photoreceptor degeneration, i.e., the common outcome of most forms of IRDs. Mitochondrial dysfunction is proving to constitute one of the key pathogenic events in IRDs and we previously reported that the downregulation of the miRNAs miR-181a and b (miR-181a/b) enhances mitochondrial turnover in models of primary retinal mitochondrial diseases. We now show that miR-181a/b silencing has a beneficial effect also in IRDs. In particular, the subretinal injection of an adeno-associated-viral vector (AAV) that harbours a miR-181a/b inhibitor (sponge) sequence improves retinal morphology and visual function both in models of autosomal dominant (RHO-P347S), and of autosomal recessive (rd10) IRD. Moreover, we demonstrate that miR-181a/b downregulation modulates the level of the mitochondrial fission-related protein Drp1 and rescues the mitochondrial fragmentation in RHO-P347S photoreceptors. Overall, these data support the potential use of miR-181a/b downregulation as an innovative mutation-independent therapeutic strategy for IRDs, which can be effective both to delay disease progression and to aid gene-specific therapeutic approaches. Finally, we are also carrying out medium/high content screening approaches, both in in vitro and in vivo systems, to identify in a more systematic manner, additional miRNAs whose expression modulation can exert a protective action on IRDs.

Modulazione dell'espressione del microRNA-181: 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 il microRNA miR-181 è in grado di rallentare la progressione di alcune forme di IRD e potrebbero quindi in futuro essere utilizzato come strumento terapeutico per queste condizioni.

Disease Name:

Inherited Retinal Disease

Nome malattia:

Retinopatie Ereditarie

Project number:

TGM22GM03

134. IDENTIFICATION OF DRUGS FOR AUTOSOMAL DOMINANT OPTIC ATROPHY (ADOA): FROM ADOA RCGS MODELS TO MICROPARTICLE-BASED DRUG DELIVERY IN AN ADOA MOUSE MODEL

Lacombe A.*, Mendonca A.P., Rampado R., Caliceti P., Salmaso S., Scorrano L.

University of Padova ~ Padova ~ Italy

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is a hereditary optic neuropathy characterized by the progressive bilateral loss of vision for which no treatment currently exists. Mutations in the mitochondrial protein Optic Atrophy 1 (Opa1) are associated with ADOA which affect primarily Retinal Ganglion Cells (RGCs) causing optic nerve degeneration. RGCs carrying mutated Opa1 display excess autophagy, accumulation of autophagosomes in axonal hillocks and mitochondrial depletion along axons, all associated with loss of vision in an ADOA mouse model. Remarkably, genetic inhibition of autophagy restored both axonal mitochondria distribution and vision in ADOA mice. We hence reasoned that pharmacological inhibition of pathways connecting ADOA mitochondria to autophagy hyperactivation could restore axonal mitochondrial distribution in ADOA RGCs, ultimately interrupting the pathogenetic cascade that leads to blindness. To this end, we seek to identify drugs rescuing axonal mitochondrial content in ADOA RGCs, and to establish a novel drug delivery strategy to efficiently curtail visual loss in our ADOA mouse model. We are therefore generating the first immortalized RGC line to facilitate our in vitro studies and allow large scale drug screening on ADOA RGCs, as well as developing PLGA microparticles loaded with FK506, a calcineurin inhibitor known to regulate autophagy in RGCs, as means to deliver it to the retina by vitreous injection in the ADOA mouse model and verify if this strategy curtails the visual loss caused by loss of Opa1 in RGCs.

Identificazione di farmaci per l'atrofia ottica autosomica dominante (ADOA): dai modelli cellulari di ADOA alla somministrazione di farmaci veicolati da microparticelle in un modello murino ADOA

L'atrofia ottica autosomica dominante (ADOA) è una neuropatia ottica ereditaria caratterizzata dalla progressiva perdita bilaterale della vista per la quale attualmente non esiste alcun trattamento. Le mutazioni nella proteina mitocondriale Atrofia ottica 1 (Opa1) sono associate all'ADOA che colpisce principalmente le cellule gangliari retiniche (RGC) causando la degenerazione del nervo ottico. Le RGC con Opa1 mutato mostrano un eccesso di autofagia (il meccanismo di riciclo delle componenti cellulari danneggiate) e riduzione del numero dei mitocondri lungo gli assoni. L'inibizione genetica dell'autofagia riesce a ripristinare la visione in un modello murino di ADOA. Abbiamo quindi ragionato che l'inibizione farmacologica dei segnali che scatenano l'iperattivazione autofagica nell'ADOA potrebbe ripristinare interrompere in definitiva la strada che porta alla cecità. Stiamo pertanto cercando di identificare farmaci che ripristinano il contenuto di mitocondri nelle RGC ADOA e di stabilire una nuova strategia di somministrazione di farmaci per ridurre efficacemente la perdita visiva nel nostro modello murino ADOA. Stiamo quindi generando per la prima volta una cellula RGC da coltivare in laboratorio per consentire lo screening di farmaci su larga scala ADOA, e sviluppando microparticelle caricate con FK506, un farmaco noto per regolare l'autofagia negli RGC, in modo da poterlo rilasciare a livello della retina mediante iniezione vitreale nel modello murino ADOA e verificare se questa strategia riduce la perdita visiva nel topo ADOA.

Disease Name:

Optic Atrophy, autosomal dominant

Nome malattia:

Atrofia ottica dominante

Project number:

GGP19089

135. PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR (PEDF) AND DERIVED PEPTIDES AS THERAPEUTIC AGENTS FOR INHERITED RETINAL DEGENERATION

Bighinati A.^[1], Adani E.^[1], Piano I.^[2], Gargini M.C.^[2], Ottonelli I.^[1], Tosi G.^[1], Becerra S.P.^[3], Marigo V.*^[1]

^[1]Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia ~ Modena ~ Italy, ^[2]University of Pisa, Department of Pharmacy ~ Pisa ~ Italy, ^[3]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 small 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 to the PEDF receptor and 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 entire PEDF or 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 15 days or 6 months after delivery. The promising results prompt us to further characterize the neuroprotective properties of PEDF and 17mer[H105A] in the degenerating retina and to evaluate their delivery with novel drug delivery systems: nanoparticles can reduce drug loss due to degradation and promote specific accumulation, while hydrogels could help prolong the release and reduce the dosing frequency, overall increasing the therapeutic efficacy (4, 5).

Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF) e peptidi derivati 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 in modelli di RD il PEDF o il 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 sulla caratterizzazione dell'attività neuroprotettiva di PEDF o del peptide 17mer[H105A] nella retina e di valutare la veicolazione basata su nanoparticelle e altri sistemi innovativi per proteggere il farmaco dalla degradazione, promuovere l'accumulo selettivo sulla retina, e prolungarne il rilascio, in modo da aumentare l'efficienza terapeutica (4,5).

Disease Name:

Retinitis Pigmentosa

Nome malattia:

Retinite Pigmentosa

Project number:

GGP19113

136. MODULATING AUTOPHAGY: A NOVEL GENE-INDEPENDENT THERAPEUTIC TREATMENT FOR ADRP

Intartaglia D.^[1], Giamundo G.^[2], Salierno F.^[1], Conte I.^[1]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli (Naples) ~ Italy, ^[2]Università di Napoli "Federico II" ~ Napoli ~ Italy

Retinitis Pigmentosa is a group of inherited diseases that cause a decline in vision as photoreceptor cells in the retina degenerate. This inherited condition, for which no treatment options exist, leads to almost complete blindness in the fourth or fifth decade of life, leaving few times for therapeutic intervention. Recent advances in autosomal dominant Retinitis Pigmentosa, which represent up to 30% of all cases, have pointed out on a common pathological mechanism characterized by accumulation of mutated proteins into insoluble and toxic aggregates in photoreceptor cells. Nevertheless, despite these extraordinary results, developing therapeutic strategies to treat genetic dominant traits still represents a challenge. Hence, it is becoming clear that new therapeutic strategies must be aimed at alleviating pathological protein accumulation and re-establishing normal degradation in a mutational independent manner. Recent data deriving from my laboratory have depicted a deep understanding of the biological mechanisms regulating cell clearance in the RPE/PR crosstalk. We showed that light-dependent modulation of autophagy pathway in RPE/PR is regulated by a gene network employing the miR-211, a member of miR-204/211 miRNA family, and its target gene, namely Ezrin. Notably, we found that mutation in this miRNA family caused a dominant form of inherited retinal dystrophy (IRD) in human and a progressive death of PR cells in mice. Strikingly, by enhancing this metabolic pathway, we obtained the first in vivo proof-of-concept for the therapeutic potential of cell clearance in mouse models for

a dominant form of retinitis pigmentosa (e.g. RHO-P23H and RHO-P347S). This approach is designed to work independent of the disease-causing gene mutation, so it has the potential to help people with a broad range of inherited retinal diseases and to translate cell clearance discoveries into novel therapeutic strategies for adRP.

La retinite pigmentosa è un gruppo di malattie ereditarie che causano un declino della vista come cellule fotorecetrici la retina degenerata. Questa condizione ereditaria, per la quale non esistono opzioni di trattamento, porta a quasi cecità completa nella quarta o quinta decade di vita, lasciando poche volte per l'intervento terapeutico. I recenti progressi nella retinite pigmentosa autosomica dominante, che rappresentano fino al 30% di tutti i casi, hanno sottolineato su un comune meccanismo patologico caratterizzato dall'accumulo di proteine mutate in aggregati insolubili e tossici nelle cellule dei fotorecettori. Tuttavia, nonostante questi straordinari risultati, lo sviluppo di strategie terapeutiche per trattare i tratti genetici dominanti rappresenta ancora una sfida. Quindi, lo è diventando chiaro che le nuove strategie terapeutiche devono mirare ad alleviare la proteina patologica accumulo e ristabilire il normale degrado in modo indipendente dalla mutazione. Dati recenti derivanti dal mio laboratorio hanno rappresentato una profonda comprensione dei meccanismi biologici che regolano clearance cellulare nel crosstalk RPE/PR. Abbiamo mostrato quella modulazione dipendente dalla luce del percorso dell'autofagia in RPE/PR è regolato da una rete genica che impiega il miR-211, un membro della famiglia dei miRNA miR-204/211, e il suo gene bersaglio, vale a dire Ezrin. In particolare, abbiamo scoperto che la mutazione in questa famiglia di miRNA ha causato una dominante forma di distrofia retinica ereditaria (IRD) nell'uomo e una morte progressiva delle cellule PR nei topi. Sorprendentemente, da potenziando questa via metabolica, abbiamo ottenuto il primo proof-of-concept in vivo per la terapia potenziale di clearance cellulare nei modelli murini per una forma dominante di retinite pigmentosa (ad es. RHO-P23H e RHO-P347S). Questo approccio è progettato per funzionare indipendentemente dalla mutazione del gene che causa la malattia, quindi è così il potenziale per aiutare le persone con una vasta gamma di malattie retiniche ereditarie e per tradurre la clearance cellulare scoperte in nuove strategie terapeutiche per adRP.

Disease Name:

Retinitis Pigmentosa, autosomal dominant

Nome malattia:

Retinite pigmentosa autosomica dominante

Project number:

TGM22CBDM03

137. THERAPEUTIC HOMOLOGY-INDEPENDENT TARGETED INTEGRATION IN RETINA AND LIVER

Esposito F.*^[1], Dell'aquila F.^[1], Ferla R.^[1], Padmanaban A.^[1], Lupo M.^[1], Llado M.^[1], Tornabene P.^[1], Sureda Horrach P.^[1], Auricchio S.^[1], Marrocco E.^[1], Dell'Anno M.^[1], Nusco E.^[1], Trapani I.^[1], Surace E.M.^[2], Manfredi A.^[3], Di Filippo L.^[4], Torella A.^[1], Peluso G.^[1], Cacchiarelli D.^[1], Nigro V.^[1], Auricchio A.^[5]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), 80078 Pozzuoli, Italy; ~ Pozzuoli ~ Italy, ^[2]Medical Genetics, Department of Translational Medicine, Federico II University, 80131 Naples, Italy ~ Napoli ~ Italy, ^[3]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Armenise/Harvard Laboratory of Integrative Genomics, 80078 Pozzuoli, Italy ~ Napoli ~ Italy, ^[4]Next Generation Diagnostic Srl, 80078 Pozzuoli, Italy. ~ Pozzuoli ~ Italy, ^[5]~ Naples ~ Italy

Gene therapy with adeno-associated viral (AAV) vectors holds great promise to provide long-term expression of therapeutic transgenes after a single administration. However, some of the outstanding challenges include counteracting gain-of-function mutations which do not benefit from

traditional gene replacement therapy, as well as to obtain persistent transgene expression from proliferating tissues, such as newborn liver, given the predominantly episomal nature of AAV DNA. To overcome these limitations, we used genome editing based on CRISPR/Cas9-mediated homology-independent targeted integration (HITI) of a therapeutic transgene.

We have developed AAV-HITI to target an autosomal dominant form of Retinitis Pigmentosa due to a prevalent P23H RHO (Rhodopsin) mutation. Using a P23H knock-in mouse model, we show that AAV-HITI efficiently targets photoreceptors in heterozygous mice with preliminary evidence of improvement of the retinal phenotype.

In addition, to address the issue of AAV-mediated persistent transgene expression in liver, we have developed AAV-HITI that targets the 3' end of the highly transcribed mouse Albumin (mAlb) locus. Using a mouse model of mucopolysaccharidosis type VI (MPSVI), a severe lysosomal storage disease due to the deficiency of the arylsulfatase B (ARSB) enzyme, we show that neonatal AAV-HITI results in circulating supraphysiological levels of enzyme and phenotypic improvement up to 1 year after delivery.

Overall, these results support the application of AAV-HITI for the treatment of diseases affecting different organs that cannot be addressed by traditional AAV gene therapy.

La terapia di sostituzione genica mediata da vettori virali adeno-associati (AAV) è considerata una strategia all'avanguardia nel trattamento delle condizioni ereditarie recessive derivanti da mutazioni con perdita di funzione. Questa strategia è meno applicabile per il trattamento di malattie con a trasmissione autosomica dominante, dovute a mutazioni che apportano un guadagno di funzione con effetto tossico.

Inoltre, data la natura prevalentemente non integrante dei vettori AAV, l'utilizzo della terapia genica in tessuti altamente proliferanti come il fegato neonatale limita la possibilità di ottenere un'espressione persistente nel tempo di un transgene terapeutico.

Per superare queste limitazioni, abbiamo sviluppato un approccio di terapia genica basato sull'integrazione mirata indipendente dall'omologia veicolato da vettori AAV (AAV-HITI) mediante il sistema CRISPR/Cas9 in due tessuti differenti: la retina ed il fegato.

Nella retina utilizziamo l'approccio AAV-HITI per trattare una forma autosomica dominante di retinite pigmentosa causata dalla mutazione P23H nel gene della rodopsina in un modello murino della patologia, dimostrando che il nostro sistema è efficiente nei fotorecettori.

Nel fegato neonatale, per superare il limite legato alla persistenza del transgene terapeutico in un tessuto altamente proliferante, abbiamo utilizzato l'approccio AAV-HITI per integrare il transgene terapeutico nel locus dell'albumina. Utilizzando il modello malattia della mucopolisaccaridosi di tipo VI, una grave malattia da accumulo lisosomiale dovuta alla carenza dell'enzima arilsulfatasi B, dimostriamo che il trattamento neonatale con AAV-HITI risulta in

livelli circolanti suprafisiologici dell'enzima migliorando il fenotipo dei topi trattati fino ad un 1 anno dalla somministrazione.

Nel complesso, questi risultati supportano l'applicazione di AAV-HITI per il trattamento di malattie che colpiscono organi differenti e che non possono essere trattate con la tradizionale terapia genica.

Disease Name:

Retinitis Pigmentosa; Mucopolysaccharidosis type VI

Nome malattia:

Retinite Pigmentosa; Mucopolisaccaridosi di tipo VI

Project number:

TGM22MT04

138. UBIAD1 AND FERROPTOSIS: EXPLORING A CURE FOR SCHNYDER CORNEAL DYSTROPHY (SCD)

Tosi G.^[1], Lugato P.^[1], Simonato M.^[2], Cogo P.^[2], Santoro M.*^[1]

^[1]University of Padua ~ Padova ~ Italy, ^[2]University of Udine ~ Udine ~ Italy

Schnyder Corneal Dystrophy (SCD) is a rare autosomal-dominant genetic eye disease leading to a progressive decrease in visual acuity and blindness. SCD is characterized by bilateral corneal opacification which is given by an excess of free cholesterol and phospholipids. Corneal transplantation is the only available treatment. In order to develop therapeutic interventions that could treat or prevent the disease, a clear understanding of SCD pathogenesis is needed. SCD has been associated to dominant mutations in the human UBIAD1 gene. The role of the SCD mutations in UBIAD1 function and, possibly, in lipid metabolism is unknown. We discovered that the cornea of SCD mice models are affected by oxidative stress and lipid peroxidation. Also, the introduction of SCD mutations in epithelial cells is associated with ferroptosis, a type of programmed cell stress dependent on iron and characterized by the accumulation of lipid peroxides, eventually leading to cell death. Our goal is to confirm that SCD patients are affected by the accumulation of lipid peroxides and ferroptosis in their cornea. Then, by modeling SCD in mouse and human corneal stem cell models we aim to demonstrate that UBIAD1SCD variants are unable to contribute to CoQ10 synthesis and thus provide antioxidant protection for lipids in the plasma membrane. Once validated, the identification of ferroptosis-based mechanisms that cause SCD will lead to the development of novel therapeutic and treatment strategies in the prevention and cure of this corneal dystrophy and possibly others (e.g. drug development and gene therapies).

Una malattia genetica è una malattia causata da anomalie nei geni o nei cromosomi. Nella maggior parte dei casi le malattie geniche sono rare e colpiscono una persona su diverse migliaia o milioni. In questo progetto ci occupiamo di una malattia genica chiamata Distrofia Corneale di Schnyder (Schnyder Corneal Dystrophy; SCD). La SCD è una malattia genetica autosomica dominante caratterizzata da una progressiva cecità dovuta al progressivo accumulo di lipidi (colesterolo e fosfolipidi) nella cornea di questi pazienti. Non esiste attualmente cura se non la rimozione e sostituzione della cornea nei pazienti affetti da questa malattia. La malattia SCD è stata associata a mutazioni del gene UBIAD1. UBIAD1 è una proteina transmembrana la cui funzione è ancora non completamente compresa del tutto. Usando modelli animali ma anche tessuti derivati da pazienti SCD, in questo progetto ci prefiggiamo di studiare i meccanismi molecolari che sono attivati dalle mutazioni SCD presenti nel gene UBIAD1 per capire quali sono i difetti cellulari alla base di questa patologia umana. Lo scopo finale è, quindi, quello di sviluppare delle strategie terapeutiche adeguate (farmacologiche, genetiche e cellulari) per curare i pazienti affetti da SCD.

Disease Name:

Schnyder corneal dystrophy

Nome malattia:

Distrofia del Cristallino di Schnyder

Project number:

GGP20003

139. MUTATION-INDEPENDENT GENOME EDITING APPROACHES FOR TREATMENT OF STARGARDT DISEASE

Pugni E., Tenderini E., Cascone A., Razzano F., Mazzaro N., Lupo M., Casciello M., Marrocco E., Trapani I.*

Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy

Genome editing via the CRISPR-Cas9 system is an exciting field of biomedical research which is gaining increasing interest for treatment of several diseases. However, classical genome editing approaches still have limitations, including: i. sequence-specificity, that limits their applicability to diseases with high allelic heterogeneity; ii. inability of the currently available techniques to achieve efficient precise integration of a corrective DNA template in post-mitotic cells. These limitations have thus far hindered development of effective gene editing approaches for several inherited retinal diseases, including the most common form of inherited macular degeneration, Stargardt disease (STGD1), which is due to more than 1200 different mutations in the large retinal-specific ABCA4 gene. Therefore, in this project, we aim to develop novel adeno-associated viral vectors-based genome editing strategies for integration of large templates in ABCA4, to allow correction of multiple mutations with a single therapeutic DNA template. To achieve integration of the template we planned to explore different repair pathways which are active in post-mitotic cells like photoreceptors, the target cells for STGD1 treatment. We have developed candidate sets of AAV-Abca4 vectors, which we show are capable of effectively mediate template integration at the endogenous locus, in vitro, in murine HEPA1-6 cell lines, resulting in Abca4 expression. In vivo evaluation of the efficiency of the developed approaches in the retina of the Abca4 *-/-* mouse model shows correct donor DNA integration in injected eyes, which effectively results in Abca4 expression. Further evaluation of the therapeutic efficacy of the approaches in Abca4 *-/-* mice is ongoing.

Approcci innovativi di modificazione del genoma per il trattamento della sindrome di Stargardt. La modificazione genomica tramite il sistema CRISPR-Cas9 è un'area della ricerca biomedica che sta riscuotendo un crescente interesse per molteplici scopi, incluso il trattamento di malattie ereditarie, ed è, pertanto, in una fase di sviluppo molto attiva. Tuttavia, gli approcci di modificazione genomica basati sulla Cas9 finora sviluppati hanno mostrato diversi limiti, che ne restringono l'applicabilità in campo terapeutico. Tra le malattie ad oggi inaccessibili vi sono diverse forme di degenerazione retinica ereditaria, inclusa la forma più comune di degenerazione maculare ereditaria - la sindrome di Stargardt (STGD1), dovuta a più di 1200 diverse mutazioni nel gene ABCA4. Pertanto, obiettivo del presente progetto è di sviluppare nuove strategie di modifica del genoma basate sull'uso del sistema CRISPR-Cas9, che, superando le attuali limitazioni, possano espandere l'applicabilità di questo potente strumento biotecnologico. In particolare, nel corso del progetto, svilupperemo strategie basate sull'uso di vettori virali adeno-associati (AAV) per veicolare la Cas9 e lunghi frammenti di DNA che, a seguito di integrazione nel locus endogeno del gene ABCA4, correggano le porzioni del gene mutate nei pazienti. Tale approccio presenterà il vantaggio di essere efficace indipendentemente dalla mutazione causativa della malattia, e di ottenere, quindi, un singolo agente terapeutico per la correzione di molteplici mutazioni del gene ABCA4. Abbiamo ad oggi sviluppato diverse versioni di vettori AAV-Abca4, che hanno mostrato essere in grado di correggere il gene ABCA4 in modelli in vitro ed in vivo. La valutazione dell'efficacia terapeutica di tali candidati vettori è in corso.

Disease Name:

Stargardt disease

Nome malattia:

Sindrome di Stargardt

Project number:

TGM22MT02

Genetic gastroenterological disease

140. AN IN VIVO MODEL OF INTRACTABLE R257C-ACTG2 VISCERAL MYOPATHY TO STUDY PATHOGENESIS AND TO IDENTIFY NEW DISEASE TARGETS

Galeone A.^[1], Viti F.^[2], Ceccherini I.^[3], Vaccari T.*^[4]

^[1]CNR Nanotech ~ Lecce ~ Italy, ^[2]CNR- IBF ~ Genova ~ Italy, ^[3]Ospedale Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[4]Dipartimento di Bioscienze Università di Milano ~ Milano ~ Italy

Visceral myopathies (VSCM) are a group of rare genetic diseases impairing both oral nutrition and development in affected individuals. Forms of VSCM characterized by lack of visceral muscle contraction often result in chronic pseudo-obstruction (CIPO), a life-threatening condition requiring immediate medical attention. To date, resolutive therapies are lacking and patients often require total parenteral nutrition or even intestinal transplantation. Our project aims at providing a highly innovative platform to study one of the most common and intractable forms of pediatric CIPO due to a R257C mutation in the actin gamma2 gene (ACTG2). Thus, we have established an in vivo model using the fruit fly *Drosophila melanogaster* that mimics CIPO and will inform us on its pathogenesis. We propose to use the model to explore fly gut structure, contractility and ability to allow food transit. We will also study the little explored cellular aspects of myopathy focusing on actin function and autophagy. Finally, we will identify candidate genetic determinants of the disease and select potential existing drugs that might ameliorate defects in contractility. Validation of initial hits will be performed by collaborators that will assess activity on edited human smooth muscle cells. By exploiting a platform that mimics the milieu of physiological and pathological intestinal muscle tissue, our project represents an original approach, which we hope will make inroads toward knowledge-based novel treatments for a neglected syndrome.

Le miopatie viscerali sono un gruppo di malattie congenite rare che compromettono la capacità di digestione. Le forme caratterizzate dalla mancanza di contrazione dei muscoli viscerali spesso danno luogo alla pseudo-ostruzione intestinale cronica (CIPO), una malattia che mette a rischio la vita del paziente e che richiede immediata attenzione medica. Ad oggi non esistono terapie risolutive e i pazienti necessitano di nutrizione attraverso il circolo sanguigno o addirittura un trapianto di intestino. Il nostro progetto fornirà una metodo innovativo di studio di una delle forme più incurabili di CIPO, quella causata dalla mutazione R257C nel gene ACTG2. Abbiamo generato un modello animale usando il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* che riproduce CIPO e ci aiuterà a capire lo sviluppo della malattia. Nel progetto proponiamo di usare il modello animale per esplorare la struttura del tubo digerente, la sua abilità di contrarsi e di permettere il passaggio del cibo. Studieremo anche gli aspetti cellulari della miopatia focalizzandoci sulla funzionalità dell'actina e di processi come l'autofagia e la mitofagia. Infine, identificheremo geni e composti farmaceutici, tra quelli noti regolare la contrazione, che possano influenzare gli effetti di CIPO nei moscerini. Con dei collaboratori esperti, cercheremo di confermare i risultati ottenuti nel modello animale utilizzando cellule umane modificate per replicare il difetto genetico dei pazienti. Sfruttando una piattaforma sperimentale che mima le caratteristiche fisiologiche e patologiche del tessuto muscolare intestinale, il nostro progetto rappresenta un approccio nuovo che speriamo porta a nuovi trattamenti ispirati da una conoscenza più dettagliata della sindrome CIPO.

Disease Name:

Chronic intestinal pseudoobstruction; Familial visceral myopathy

Nome malattia:

Pseudo-Ostruzione Intestinale Cronica; Miopatia viscerale familiare

Project number:

GMR22T1078

141. THE BIOMOLECULAR CASCADE UNDERGOING CELL CONTRACTION IN PRESENCE OF VSCM CAUSATIVE MUTANTS

Picco C., Magrassi R., Nizzari M., Viti F.*

Institute of Biophysics - National Research Council ~ Genova ~ Italy

Visceral myopathy (VSCM, myogenic CIPO) is an ultra rare genetic disease compromising the function of some internal organs and, majorly, causing the impairment of intestinal peristalsis [1]. It is a seriously disabling pathology, without therapy and whose molecular mechanism of onset is not known yet. Most of the associated causative mutations are localized on ACTG2 gene [2,3] and seem to be responsible for compromising cell contraction ability (Viti et al, in revision). In this work we used human intestinal smooth muscle cells, transiently transfected to express three of the VSCM causative ACTG2 mutants: R257C, R178C, R38H. We chemically induced cell contraction, and through calcium imaging we measured the intracellular calcium concentration, which is recognized to trigger smooth muscle contraction. In preliminary results we observed a low level of calcium in presence of R257C ACTG2 compared to control, although we need to perform additional studies to assess the involvement of calcium sources in presence of this mutant. Through RNA sequencing we performed transcriptomic analysis, comparing the expression profile of non-contraction vs. contraction conditions, in both wild type and mutant ACTG2 cells. This preliminary analysis seems to highlight the involvement of endoplasmic reticulum in the presence of R257C ACTG2: this finding could, in principle, correlate with the deficient availability of intracellular calcium in the same condition. This opens novel scenarios for the investigation of the molecular mechanisms underlying the disease.

La risposta molecolare sottostante alla contrazione cellulare in presenza di mutazioni causative della miopatia viscerale

La miopatia viscerale (VSCM, CIPO miogenica) è una malattia genetica ultra rara, che coinvolge alcuni organi interni, in particolare l'intestino che non mostra adeguata peristalsi. E' una patologia gravemente invalidante, orfana di terapia e di cui non è noto il meccanismo molecolare di insorgenza. A questa malattia sono state associate alcune mutazioni, per la maggior parte localizzate su una actina (ACTG2). Scopo del progetto è stato lo studio del processo molecolare alla base della contrazione delle cellule di muscolo intestinale, per verificare quale aspetto della contrazione sia perturbato dalla presenza della malattia. A tale scopo abbiamo mimato in vitro la presenza di malattia, utilizzando una linea cellulare di muscolo liscio intestinale umano in cui abbiamo introdotto 3 mutazioni di ACTG2 (R257C, R178C, R38H), ciascuna in grado di causare una diversa forma di VSCM. Inducendo chimicamente la contrazione abbiamo contestualmente verificato il livello di calcio intracellulare, che è il fattore scatenante della contrazione, e la cascata molecolare che ne deriva. Nonostante nel processo di contrazione di muscolo liscio intestinale il calcio intervenga prima del coinvolgimento di ACTG2, i risultati preliminari hanno messo in luce una concentrazione di calcio in presenza della mutazione R257C significativamente diversa rispetto ai campioni di controllo. La causa non è ad ora nota e ulteriori valutazioni sono necessarie per chiarire l'origine di tale fenomeno, considerando che il calcio intracellulare può derivare da varie fonti, interne ed esterne alla cellula. La cascata molecolare sottostante al processo di contrazione, valutata analizzando l'espressione genica delle cellule con e senza induzione della contrazione, ha rivelato un set di interessanti processi che appaiono coinvolti durante la contrazione in presenza della mutazione R257C e non presenti nella linea cellulare di controllo. Anche a questo riguardo ulteriori test sono necessari per verificare l'attivazione di tali processi.

Complessivamente il progetto ha consentito di ottenere interessanti risultati che ci hanno permesso di disegnare nuove ipotesi sul meccanismo di insorgenza della malattia, in particolare nella forma causata dal mutante R257C di ACTG2.

Disease Name:

Chronic intestinal pseudoobstruction; Familial visceral myopathy

Nome malattia:

Pseudo-Ostruzione Intestinale Cronica; Miopatia viscerale familiare

Project number:

GSA21B001

142. CELLULAR AND PROTEOMIC APPROACHES TO STUDY THE ROLE OF ACTG2 MUTATION-MEDIATED MISFOLDING AND PROTEIN AGGREGATION AS DRUGGABLE TARGETS IN VISCERAL MYOPATHY

Salena M.T.^[1], Bartolucci M.^[1], Santamaria G.^[1], Sondo E.^[1], Bachetti T.^[2], Viti F.^[3], Petretto A.^[1], Pedemonte N.^[1], Ceccherini I.*^[1]

^[1]IRCCS Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[2]IRCCS Ospedale San Martino ~ Genova ~ Italy, ^[3]Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche ~ Genova ~ Italy

Heterozygous mostly de novo variants of the ACTG2 gene are detected in around 50% of patients with visceral myopathy (VSCM) (1,2). Clinical treatment is still limited, knowledge about pathogenic mechanisms is poor, and new therapeutic approaches are urgently needed to restore smooth muscle function (3-6).

In the present Seed Grant Telethon Project we aimed to test the hypothesis that VSCM is underpinned by misfolded ACTG2 mutant proteins, challenging protein quality control and proteolytic degradation systems, and to obtain information on druggable genes / pathways / processes. To this end, fibroblasts from 4 patients with ACTG2 variants (3 severe p.R257C and 1 mild p.R38H), 5 non-CIPO or healthy controls and 3 Hirschsprung patients (HSCR) have been studied for: i) cell phenotype, ii) intracellular aggregates, iii) proteasome and autophagy, iv) effect of candidate drugs.

The morphological analysis of the F-actin cytoskeleton concerned the texture and the anisotropy of the cytoskeleton filaments. Only anisotropy was able to slightly distinguish VSCM from non-CIPO and HSCR controls and, interestingly, to robustly discriminate severe VSCMs from all controls. Moreover, aggregates resulted more frequent in VSCM cells than in control fibroblasts and co-localized with Ubiquitin and HSP27, two players of the heat shock response and proteasome mediated degradation of putatively unfolded proteins.

Proteasome and autophagy enhancers and inhibitors allowed to confirm that these two cellular clearance machineries are involved in VSCM pathogenesis, being unable to cope with the degradation of all the defective ACTG2 proteins, compared to non-CIPO and healthy controls, and that drugs known to modulate these processes consistently present abnormal responses.

Finally, the whole aggregate proteome was characterized by mass-spectrometry in 4 patient and 2 control fibroblast cell lines, thus revealing >7000 proteins, 515 of which significantly modulated between the two cohorts. The GO Biological Process annotations confirmed the expected involvement of VSCM cells in "microtubule cytoskeleton organization", "smooth muscle cell migration", "actin filament-based movement" as well as the enrichment of unexpected pathways that highlighted potential roles of ACTG2 in nuclear DNA functions and mitochondrial and ribosomal biogenesis and homeostasis. Other studies will also be needed to investigate the role

that ACTG2 has shown in the nucleus and in activities related to cell replication and gene expression.

La miopatia viscerale (VSCM) è un grave difetto della motilità gastro-intestinale dovuto alla presenza di varianti, dovute principalmente ad eventi mutazionali de-novo, del gene codificante per l'actina del muscolo liscio viscerale (ACTG2). Il trattamento clinico della VSCM è ancora limitato, concentrandosi principalmente sulla gestione dei sintomi piuttosto che sul trattamento della malattia: i pazienti sono spesso sottoposti a chirurgia addominale e alla sostituzione del cibo con nutrizione parenterale totale. Nuovi approcci terapeutici per ripristinare la funzione muscolare e migliorare la qualità di vita dei pazienti sono auspicabili.

Sia i dettagli molecolari dei meccanismi patogenetici alla base della VSCM che i possibili bersagli farmacologici non sono stati indagati a sufficienza. Nel presente progetto abbiamo verificato l'ipotesi che la patogenesi molecolare della VSCM sia sostenuta dalla persistenza di proteine ACTG2 incapaci di ripiegarsi correttamente, dalla risposta allo stress cellulare e dal blocco dei sistemi di clearance cellulare, cioè ubiquitina-proteasoma e autofagia.

A questo scopo, i fibroblasti di 4 pazienti con varianti ACTG2 (3 p.R257C grave e 1 p.R38H lieve), 5 controlli non CIPO o sani e 3 pazienti Hirschsprung (HSCR) sono stati studiati per: i) fenotipo cellulare, ii) aggregati intracellulari, iii) proteasoma e autofagia, iv) effetto di farmaci candidati.

L'analisi morfologica del citoscheletro di F-actina mediante la misura dell'anisotropia è stata in grado di distinguere VSCM (specialmente le cellule derivanti da pazienti gravi) dai controlli non CIPO e HSCR. Inoltre, gli aggregati sono risultati più frequenti nelle cellule VSCM che nei fibroblasti di controllo e co-localizzati con Ubiquitina e HSP27, due attori della risposta allo stress cellulare e del proteasoma. L'uso di potenziatori e inibitori di questi sistemi di smaltimento delle proteine difettose hanno permesso di confermare il loro coinvolgimento nella patogenesi della VSCM, non essendo in grado di far fronte alla degradazione di tutte le proteine ACTG2 mutate, rispetto ai controlli sani e non-CIPO.

Infine, l'intero set di proteine dei fibroblasti sotto esame è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa in cellule di 4 pazienti e 2 controlli, rivelando 515 proteine significativamente modulate tra le due coorti. Le annotazioni effettuate hanno confermato il previsto coinvolgimento delle cellule VSCM nell'"organizzazione del citoscheletro dei microtubuli" e nella "migrazione delle cellule muscolari lisce", nonché potenziali ruoli di ACTG2 inattesi nelle funzioni del DNA nucleare e nella biogenesi e omeostasi mitocondriale e ribosomiale. Saranno necessari anche altri studi per indagare il ruolo che l'ACTG2 ha mostrato nel nucleo e nelle attività legate alla replicazione cellulare e all'espressione genica.

Disease Name:

Chronic intestinal pseudoobstruction; Familial visceral myopathy

Nome malattia:

Pseudo-Ostruzione Intestinale Cronica; Miopatia viscerale familiare

Project number:

GSA21B003

Genetic hematologic disease

143. AL AMYLOIDOSIS: GENE RESTRICTION REVEALS THE HIDDEN MOLECULAR BASIS OF AMYLOID TRANSFORMATION OF IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAINS

Marchese L.^[1], Mimmi M.C.^[1], Raimondi S.^[1], Mangione P.P.^[1], Corazza A.^[2], Natalello A.^[3], Ami D.^[3], Canetti D.^[4], Verona G.^[4], Malinverni S.^[1], Nocerino P.^[1], Lampis A.^[1], Brambilla F.^[6], Di Silvestre D.^[6], Mauri P.^[6], Bellotti V.^[5], Giorgetti S.^[1], Lavatelli F.*^[1]

^[1]Università di Pavia ~ Pavia ~ Italy, ^[2]Università di Udine ~ Udine ~ Italy, ^[3]Università di Milano Bicocca ~ Milano ~ Italy, ^[4]University College London ~ London ~ United Kingdom, ^[5]Policlinico San Matteo ~ Pavia ~ Italy, ^[6]ITB-CNR ~ Segrate ~ Italy

Introduction. AL amyloidosis is a rare, life-threatening disease caused by deposition of immunoglobulin light chains (LCs) as amyloid fibrils in vital organs. Specific LCs germ line genes are associated with AL, but the amyloidogenic mechanisms in vivo are still obscure. Guided by ex vivo evidence [1-3], this project stems from the hypothesis that the tissue environment plays a key pathogenic role: post-translational remodeling of LCs harboring specific mutations may generate aggregation-prone species, and interaction with other molecules may modulate deposition. In this project, we aim to elucidate the mechanisms driving amyloidogenesis by LCs from TDark germ line genes.

Methods. IGLV6-57 and IGLV1-51 LCs proteoforms, consistent with those previously characterized in human amyloid, have been produced as recombinant proteins. Fibrillogenesis kinetics, molecular dynamics, cross-seeding and fibril structure are being studied by biophysical, imaging and spectroscopic approaches, and by NMR. Natural amyloid interactors for in vitro studies were selected, based on bioinformatic analysis of previously collected tissue proteomics data; their interaction with LCs and the effects on fibrillogenesis are being studied by proteomics, NMR and biophysical approaches.

Results. Full-length LCs and fragments were purified, both unlabeled and isotopically labeled. In contrast to the full-length LCs, the tested fragments are amyloidogenic in vitro under physiological conditions, with different kinetics. NMR and spectroscopic data for major proteoforms are being collected and analyzed to understand their structure and dynamics. Ongoing bioinformatic evaluation has provided information on the amyloid interactome and on deranged protein interaction networks in diseased tissues.

Discussion. We have set up a new biocompatible model to study LC fibrillogenesis, expected to be pivotal to understand the molecular bases of AL amyloidosis and to provide hints for modulating the pathological processes.

Amiloidosi AL: l'uso di specifici geni germline rivela le basi molecolari alla base dell'amiloidogenicità delle catene leggere

Introduzione. Le amiloidosi sono patologie causate dalla progressiva deposizione tissutale di materiale insolubile, costituito da proteine con conformazione alterata. L'amiloidosi AL, in particolare, è una forma rara e severa in cui gli aggregati derivano da catene leggere (CL) immunoglobuliniche. Solo CL con determinate sequenze e codificate da particolari geni (fra cui i geni TDark IGLV1-51 ed IGLV6-57) causano amiloidosi, ma i fattori causali rimangono sconosciuti. La scarsa conoscenza della fisiopatologia indebolisce la possibilità di sviluppare strategie che blocchino il processo di aggregazione. Partendo da tali considerazioni e dall'osservazione che gli

attuali modelli sperimentali non riproducono adeguatamente le caratteristiche dei depositi di amiloide naturali [1-3], questo progetto mira a caratterizzare i meccanismi di formazione di amiloide da catene leggere IGLV1-51 e IGLV6-57, costruendo un modello in vitro compatibile con il quadro patologico.

Approccio sperimentale e risultati. A tale scopo, stiamo utilizzando una combinazione di saggi biochimici e biofisici, proteomica strutturale basata su spettrometria di massa, imaging ad alta risoluzione e bioinformatica, per testare sperimentalmente l'ipotesi che la parziale degradazione delle CL nei tessuti generi specie prone all'aggregazione, e che l'interazione delle CL con altre proteine possa avere un ruolo nel modulare tale processo. I dati ottenuti, utilizzando proteine prodotte in vitro che riproducono le specie precedentemente caratterizzate nei tessuti umani, mostrano che frammenti di CL sono in grado di aggregare come fibrille amiloidi in condizioni fisiologiche. Struttura e dinamica molecolare di queste specie sono in corso di studio. Analisi bioinformatiche hanno inoltre fornito importanti informazioni sulle proteine che interagiscono con l'amiloide negli organi target, e sulle alterazioni nel normale network di interazioni molecolari a livello dei tessuti affetti.

Conclusioni. Il lavoro effettuato ha portato alla creazione di un primo modello biocompatibile per studiare l'aggregazione delle CL, che ci si attende sarà fondamentale per decifrare le basi molecolari della amiloidosi AL in vivo e per modulare i processi patologici.

Disease Name:

AL amyloidosis

Nome malattia:

Amiloidosi AL

Project number:

GJC21082

144. THE HUMAN DELTA-GLOBIN GENE AS A THERAPEUTIC TOOL FOR BETA-HEMOGLOBINOPATHIES. POST GWAS TARGET VALIDATION AND EVALUATION OF MOLECULES IN PRECLINICAL MODELS.

Marongiu M.F., Porcu S., Simbula M., Manchinu M.F., Perseu L., Poddie D., Vaccargiu S., Caria C., Faà V., Ristaldi M.S.*

IRGB-BNR ~ Monserrato (CA) ~ Italy

Inherited disorders of hemoglobin such as Beta-thalassemia (Beta-thal) and Sickle Cell Disease (SCD) affect the health of countless people worldwide (1). There is no generally available definitive treatment except for bone marrow transplantation with many limitations. Alternative therapies are under investigation but remain largely experimental and long-term effects must be estimated (2-4). Our project objective is to evaluate a possible therapeutic approach based on the enhancement of HbA2 (alpha2delta2). Although expressed at a low level, HbA2 is fully functional (5). HbA2 has been validated as a therapeutic target for Beta-thal and SCD by our lab (6,7). In a recent GWAS study CCND3 was found associated with HbA2 levels (8). The CCND3 gene encodes for the D3 cyclin, one member of the mammalian cell cycle machinery. Ccnd3 knockout mice are viable and fertile. In human and mouse D3 cyclin controls erythrocyte size and number (9). We have produced preliminary results showing that CCND3 deprivation produces a robust increase of delta-globin expression in a transgenic mouse model. This observation prompted us to study whether modulation of CCND3 expression would be able to increase HbA2 level as a therapy for Beta-thal

and SCD. To explore this, we are evaluating if the D3 cyclin gene deprivation, in vivo, would produce an increase of HbA2 sufficient to improve Beta-thal in a humanized mouse model. We have utilized a humanized transgenic mice carry a common human beta zero-thalassemia mutation (ANUN mice) (10). Breeding ANUN mice to heterozygous beta-globin knockout (th3+) mice allows the generation of ANUN/th3+ mice. This mouse has been characterized in our lab and shows a phenotype of Beta-thal intermedia as expected. We are currently evaluating if D3 cyclin gene deprivation, in this model, produces an increase of HbA2 sufficient to improve the pathology. At the same time, to evaluate if the D3 cyclin gene deprivation would increase HbA2 and HbF in human erythroid cells we have designed a genome-editing approach using the CRISPR/Cas9 technology in HUDEP-2 cells (11). Experiments and validation of the editing is in progress. We are also evaluating the effect of cell cycle modulation, obtained by pharmacological treatment, in increasing delta-globin gene expression in primary murine erythroid cell derived from a transgenic mice line containing a single copy human Beta-globin cluster (12). This secondary screening has been necessary to validate the effect of cell cycle modulators previously identified by small molecules screening on a reporter transgenic cell line (Telethon GGP14065). At the moment the biological activity of one molecule (C18) has been confirmed. The efficacy of this compound will shortly be evaluated in vivo on ANUN/th3+ mice. We are confident that the results of our project could contribute to the development of new therapeutic strategies and to the validation of a new target for the treatment of Beta-hemoglobinopathies.

IL GENE DELTA-GLOBINICO UMANO QUALE TARGET TERAPEUTICO PER LE BETA-EMOGLOBINOPATIE. VALIDAZIONE DI UN TARGET POST GWAS E VALUTAZIONE DI MOLECOLE IN MODELLI PRE-CLINICI.

La Beta-Talassemia e L'Anemia Falciforme (Beta-emoglobinopatie) sono le malattie monogeniche più frequenti al mondo e colpiscono la salute di milioni di persone. Il trapianto di midollo osseo è l'unico trattamento definitivo disponibile per queste malattie. Tuttavia, questa terapia ha dei limiti e non è accessibile alla maggior parte dei pazienti. La ricerca di terapie alternative definitive si è concentrata principalmente su approcci che utilizzano tecniche d'ingegneria genetica che sono ancora largamente sperimentali e necessitano di lunghi tempi di osservazione per valutarne l'efficacia e la sicurezza. Queste malattie, inoltre, sono diffuse soprattutto nelle aree del mondo in cui il sistema sanitario è ancora lontano dal raggiungere gli standard necessari per eseguire queste procedure. In queste aree, per quanto riguarda l'Anemia Falciforme, per esempio, ancora oggi ogni anno nascono circa 300.000 bambini affetti e 500 bambini muoiono ogni giorno per mancanza di diagnosi e terapia precoce. Sono quindi necessarie e urgenti ulteriori opzioni di terapie curative.

L'obiettivo di questo progetto è di valutare un possibile approccio al trattamento delle Beta-emoglobinopatie basato sull'aumento dell'espressione dell'emoglobina-A2 (HbA2). L'HbA2 è normalmente espressa nell'adulto a bassi livelli, ma è pienamente funzionale. Recentemente è stato scoperto che un gene (CCND3) che regola le divisioni dei globuli rossi è legato ai livelli di HbA2. La proteina prodotta da questo gene può essere modulata da molecole. Proponiamo di valutare se è possibile, attraverso la modulazione del CCND3, e di altre proteine legate al ciclo cellulare, aumentare la concentrazione di HbA2 a livelli terapeutici in modelli sperimentali di malattia. I risultati di questo progetto potrebbero portare allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per le Beta-emoglobinopatie.

Disease Name:

Beta-thalassemia; Sickle Cell Disease

Nome malattia:

Beta talassemia, Anemia Falciforme

Project number:

GGP20046

145. CELL-BASED THERAPY FOR CONGENITAL THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Trionfini P.*, Romano E., Varinelli M., Longaretti L., Tomasoni S.

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Centro Anna Maria Astori, Science and Technology Park Kilometro Rosso ~ Bergamo ~ Italy

Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura is an ultrarare recessive blood disorder characterized by the presence of microangiopathic haemolytic anaemia, thrombocytopenia and purpura caused by thrombi in the small vessels of many organs. It is characterized by the deficiency of ADAMTS13, a plasma protein that cleaves von Willebrand factor (VWF) multimers secreted by endothelial cells. The persistence of uncleaved, unusually large VWF multimers into the circulation causes platelet deposition and microthrombi formation. The current treatment, plasma infusion, is generally effective but complicated by the risk of infection and by allergic and anaphylactic reactions. Relapses are common and the mortality rate related to acute episodes remains high. Our aim is to develop a cell-based regenerative therapy based on the generation of induced pluripotent stem cells (iPSC) that are made hypoimmunogenic by ablating HLA I and HLA II, the main cause of immune-incompatibility, and therefore exploitable for all patients. To this end, using the CRISPR/Cas9 system, we successfully ablated the expression of CIITA, an HLA II transactivator, and β -2-Microglobulin (B2M), a protein required for the formation of a HLA I functional complex, on healthy iPSC. We isolated and characterized in depth a clone homozygous knockout for CIITA (c.278_279insA; p.A94Gfs*33), and compound heterozygous knockout for B2M (c.79_90delATTCAGGTTTAC, p.dell27-Y30; c.79_80delinsGTTTAC, p.I27Vfs*31) without unintended genomic mutations at off-target sites. HLA I and HLA II ablation did not affect its ability to differentiate towards hepatocytes, endothelial and hepatic stellate cells (the major ADAMTS13-producer cells). iPSC-derived hepatic stellate cells are able to synthesize ADAMTS13 paving the way for the generation of a hypoimmunogenic liver organoid that, once transplanted, releases constant therapeutic levels of functioning ADAMTS13 into the circulation protecting the patient against possible relapses.

Terapia cellulare per la cura della forma congenita della porpora trombotica trombocitopenica

La porpora trombotica trombocitopenica congenita è una rara malattia del sangue caratterizzata dalla presenza di anemia emolitica microangiopatica, trombocitopenia e porpora causata dalla presenza di trombi nei piccoli vasi sanguigni di molti organi. All'origine della malattia c'è la carenza di una proteina, ADAMTS13, prodotta dalle cellule stellate epatiche e rilasciata nel sangue dove taglia i grandi multimeri di von Willebrand (vWF) secreti dalle cellule endoteliali. In carenza di ADAMTS13, i grandi multimeri di vWF si accumulano sulla superficie dei vasi sanguigni causando la formazione di microtrombi. I pazienti vengono trattati con infusioni di plasma, generalmente efficaci ma che danno complicanze quali reazioni allergiche e anafilattiche e rischi di infezione. Le ricadute sono comuni e il tasso di mortalità correlato agli episodi acuti rimane elevato. Il nostro progetto si propone di sviluppare un nuovo approccio terapeutico di medicina rigenerativa basato sulla generazione di cellule staminali pluripotenti indotte universali (iPSC), ovvero invisibili al sistema immunitario del paziente e quindi sfruttabili per tutti i pazienti. A tal fine abbiamo eliminato l'espressione di HLA I e HLA II, le principali cause di immuno-incompatibilità, in iPSC derivate da un paziente sano. In particolare, utilizzando il sistema CRISPR/Cas9, abbiamo disattivato il gene CIITA, un fattore fondamentale per l'espressione di HLA II, e la β -2-microglobulina (B2M), una proteina necessaria per la formazione del complesso HLA I funzionale. Abbiamo quindi isolato e caratterizzato un clone knockout sia per CIITA che per B2M, privo di mutazioni genomiche indesiderate in altri punti del genoma. Le mutazioni in CIITA e B2M non hanno influenzato la capacità delle cellule di differenziarsi verso epatociti, cellule endoteliali e cellule stellate epatiche

(le principali cellule produttrici di ADAMTS13). Inoltre abbiamo dimostrato che le cellule stellate epatiche derivate da iPSC sono in grado di sintetizzare ADAMTS13. Questi risultati sono propedeutici alla generazione di un organoide epatico ipoimmunogenico composto da epatociti, cellule endoteliali e cellule stellate epatiche, che, una volta trapiantato, rilasci in circolo livelli terapeutici costanti di ADAMTS13 funzionante proteggendo il paziente da possibili ricadute.

Disease Name:

Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura

Nome malattia:

Porpora trombotica trombocitopenica congenita

Project number:

GGP20073

146. ADENOSINE DEAMINASE 2 DEFICIENCY: FROM THE UNDERLYING DISEASE MECHANISMS TO GENE THERAPY

Mesa Nunez C.^[1], Barzaghi F.^[2], Basso--Ricci L.^[1], Bulté D.^[1], Quaranta P.^[1], Rigamonti C.^[1], Pettinato E.^[1], Jofra Hernandez R.^[1], Romano A.^[1], Scala S.^[1], Aiuti A.^[1], Mortellaro A.^{*[1]}

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy,

^[2]Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Adenosine deaminase 2 deficiency (DADA2) is a life-threatening disease caused by loss-of-function mutations in the ADA2 gene. Manifestations include vasculopathy/vasculitis, ischemic strokes, intracranial hemorrhages, and immunological and hematological abnormalities. Efficacious, safe, and targeted therapeutic options for patients with DADA2 should be rapidly developed. However, there are no available data on how ADA2 regulates hematopoiesis and how its loss causes BM failure.

We investigated the population structure of early hematopoietic commitment cells in the BM of patients with DADA2 by multiparametric flow cytometry. Patients' BM exhibited a significant reduction in the total HSPC pool affecting all the HSPC subsets in adult patients, and a similar trend was observed in pediatric patients. The reduction was especially highlighted in the most primitive hematopoietic stem cell (HSC) compartment. Moreover, a reduction in the absolute number was observed in almost all cell lineages derived from DADA2 HSPCs compared with those generated from HD HSPCs. These results point to a reduced number of HSCs and most primitive progenitors in the DADA2 HSPC pool and suggest an intrinsic defect in their differentiation into mature cell populations.

There is an urgent unmet clinical need to develop safe and more effective treatments for DADA2 patients. Gene therapy (GT) has emerged as a new and successful curative alternative treatment for immune-related disorders. Lentiviral vector (LV)-derived ADA2 expression was well-tolerated in patients' CD34+ cells and did not impact HSPC multilineage differentiation potential. Our preclinical data indicate that GT might be a valid and effective treatment for DADA2.

Deficit di adenosina deaminasi 2: dai meccanismi alla base della malattia alla terapia genica

Il deficit di adenosina deaminasi 2 (DADA2) è una malattia potenzialmente letale causata da mutazioni nel gene ADA2. Le manifestazioni comprendono vasculopatie/vasculiti, ictus ischemici, emorragie intracraniche e anomalie immunologiche ed ematologiche. Per queste ragioni, è essenziale sviluppare rapidamente terapie efficaci, sicure e mirate per tali pazienti. Tuttavia, non ci sono dati disponibili su come ADA2 regoli l'ematopoiesi e su come la sua mancanza causi

l'insufficienza midollare. Abbiamo caratterizzato la composizione delle cellule emopoietiche precoci nel midollo osseo (MO) di pazienti con DADA2. Il MO dei pazienti mostra una riduzione significativa delle cellule HSPC totali e delle loro sottopopolazioni nei pazienti adulti e nei pazienti pediatrici. La riduzione è evidente soprattutto nel comparto delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) più primitive. Il numero assoluto di quasi tutti i tipi cellulari derivanti dalle cellule HSPC risultato ridotti nei pazienti rispetto ai donatori sani. Questi risultati evidenziano la presenza di un numero ridotto di HSC e di progenitori più primitivi nei pazienti con DADA2 e suggeriscono un difetto intrinseco nel processo di differenziamento delle cellule primitive nelle popolazioni mature. Essendo la DADA2 una malattia severa, debilitante, e potenzialmente pericolosa, si rende necessario sviluppare al più presto trattamenti sicuri ed efficaci per i pazienti. La terapia genica è emersa come un nuovo trattamento curativo di successo per i disturbi immuno-correlati. Si è ipotizzato che la correzione del gene ADA2 nelle cellule HSPC di paziente tramite un vettore lentivirale possa correggere il difetto della malattia. I nostri studi mostrano che la ricostituzione dell'espressione di ADA2 nelle cellule staminali ematopoietiche dei pazienti è ben tollerata. Infatti, tali cellule sono in grado di differenziarsi nelle varie sottopopolazioni cellulari. I nostri dati preclinici indicano che in futuro la terapia genica possa diventare un trattamento valido ed efficace per curare definitivamente i pazienti con DADA2.

Disease Name:

Deficiency of adenosine deaminase 2

Nome malattia:

Deficit di adenosina deaminasi 2

Project number:

TGT22C15

147. CHARACTERIZATION OF ENDOTHELIAL FUNCTION AND ANGIOGENESIS IN GLANZMANN THROMBASTHENIA: POSSIBLE ROLE IN GASTROINTESTINAL ANGIODYSPLASIA

Giglio E., Tondi F.*, Gresele P., Bury L.

Università di Perugia, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Sezione di Medicina Interna e Cardiovascolare ~ Perugia ~ Italy

Glanzmann Thrombasthenia (GT) is a rare, autosomal recessive bleeding disorder caused by variants in ITGA2B or ITGB3 genes, coding respectively for the α IIb and β 3 subunits of integrin α IIb β 3, the platelet receptor for fibrinogen. This results in an absent/defective receptor on the platelet surface, impaired platelet aggregation and bleeding.

Gastrointestinal angiodysplasia (GIA), a digestive tract vascular malformation due to abnormal angiogenesis, may lead to severe gastrointestinal bleeding (GIB), strongly contributing to the severe bleeding phenotype of GT patients. Several cases of GIA in GT patients have been reported in the literature.

Integrins play a crucial role in angiogenesis and α v β 3, which shares the β 3 subunit with α IIb β 3, is largely expressed on endothelial cells and activates angiogenesis by inducing PI3K, Erk1/2, FAK and Src activation.

Based on these premises, we hypothesize that patients with GT due to ITGB3 variants may present with abnormal angiogenesis, and this might imply that the bleeding tendency of GT patients is not only due to a platelet defect but also to vascular alterations.

Preliminary data from our group confirm this hypothesis. In particular, we assessed angiogenesis with endothelial colony forming cells (ECFCs) from two GT patients with the same ITGB3 gene

variant (p.Tyr148*) and showed defective and reduced in vitro angiogenesis. Angiogenesis was estimated by measuring total tube length and by counting tubule number and branching points. GT patient derived ECFCs when compared with healthy control ECFCs showed a significative decrease of 1) the total tube length ($3.7\pm 0.1\text{mm}$ vs $9.8\pm 0.2\text{ mm}$; $p<0.05$), the total tube number (24 ± 3 vs 92 ± 8 ; $p<0.05$) and branching points (17 ± 2 vs 55 ± 6 ; $p<0.05$).

Primary objective of this project is to shed light on the possible role of endothelial cells dysfunction in the bleeding phenotype of patients with GT caused by variants in ITGB3.

In particular, we aim to determine whether a defect of neoangiogenesis is part of the clinical picture of GT, if this is associated only with variants affecting the $\beta 3$ integrin subunit and not the αIIb subunit, and to gain insight into the signaling pathways triggered by $\alpha \text{v}\beta 3$ integrin in endothelial cells, in order to unravel possible targets for subsequent therapeutic approaches.

Specific aims are:

- to assess the impact of variants in ITGA2B and ITGB3 on $\alpha \text{v}\beta 3$ expression;
- to evaluate neoangiogenesis;
- to study $\alpha \text{v}\beta 3$ -dependent signal transduction mechanisms.

If our hypothesis is confirmed, a new pathogenic mechanism occurring in a subgroup of GT patients and involving endothelial cells and angiogenesis would be revealed, opening innovative ways to the treatment of this bleeding disorder.

Caratterizzazione della funzione endoteliale e dell'angiogenesi nella Trombastenia di Glanzmann: possibile ruolo nell'angiodisplasia gastrointestinale

Alcune malattie genetiche possono provocare manifestazioni emorragiche dovute ad alterazioni del numero o della funzione delle piastrine, piccole cellule circolanti nel sangue che svolgono un ruolo essenziale nell'arresto dell'emorragia. Una di queste condizioni è la Trombastenia di Glanzmann, una rara ma grave malattia emorragica in cui le piastrine non sono in grado di esercitare la loro funzione emostatica perché mancano di un recettore essenziale sulla loro superficie, la glicoproteina GPIIb/IIIa (o $\alpha \text{IIb}\beta 3$). Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente descritto un paziente con Trombastenia di Glanzmann e sanguinamento gastrointestinale causato da angiodisplasia gastrointestinale, una malformazione vascolare del tratto digerente dovuta ad anomalie dell'angiogenesi, che è il processo di generazione dei vasi sanguigni. Le cellule endoteliali sono le cellule che rivestono il lume interno dei vasi sanguigni ed esprimono un recettore, chiamato $\alpha \text{v}\beta 3$, che condivide la subunità $\beta 3$ con il recettore piastrinico $\alpha \text{IIb}\beta 3$. La nostra ipotesi è che le mutazioni del gene $\beta 3$ che causano la Trombastenia di Glanzmann possano anche causare angiodisplasia gastrointestinale che di conseguenza potrebbe portare a gravi emorragie gastrointestinali e miriamo quindi a svelare i meccanismi molecolari coinvolti in questo processo al fine di identificare potenziali bersagli terapeutici di questa complicità potenzialmente letale.

In questo modo, contribuiremo alla miglior conoscenza di una malattia genetica rara, trascurata da finanziamenti privati e pubblici alla ricerca, e in prospettiva potremo migliorare il suo trattamento prevenendo l'angiodisplasia gastrointestinale.

Disease Name:

Glanzmann Thrombasthenia

Nome malattia:

Trombastenia di Glanzmann

Project number:

GMR22T1059

148. ANALYSIS OF THE PGE2-MEF2A AXIS IN THE BONE MARROW MICROENVIRONMENT

Ostuni R.*

SR-Tiget ~ Milan ~ Italy

Macrophages orchestrate tissue immune homeostasis by providing trophic and differentiation cues as well as by initiating inflammatory responses to damage or infection. Aberrant macrophage activation often causes organ damage, fibrosis or autoimmunity, and excessive exposure to inflammatory insults impairs stem cell functions. In the context of hematopoietic stem cell (HSC) gene therapy, alleviation of unwanted innate immune responses is critical to preserve the engraftment and regenerative capacities of gene-modified HSCs upon transplantation. We recently identified a transcriptional circuit enabling context-dependent control of inflammatory gene expression in macrophages, which represents a potential target for immune modulation in regenerative medicine. Prostaglandin E2 (PGE2), a lipid with key roles in HSC development and maintenance, limited macrophage activation by targeting inflammatory gene enhancers marked by the transcription factor MEF2A. In this project, we will combine advanced bulk and single-cell genomics with proteomics, computational analyses, as well as functional experiments in human cells and in mouse models, to define the cellular, molecular, and functional determinants of the PGE2-MEF2A axis during bone marrow homeostasis, damage, and repair. Successful completion of the proposed research will uncover regulatory principles and mechanisms of tissue immune homeostasis. Identification of targets and regulators of the PGE2-MEF2A axis will enable its therapeutic exploitation for HSC gene therapy and regenerative medicine applications.

I macrofagi orchestrano l'omeostasi immunitaria dei tessuti fornendo segnali trofici e di differenziazione, nonché avviando risposte infiammatorie a danni o infezioni. L'attivazione aberrante dei macrofagi spesso causa danni agli organi, fibrosi o autoimmunità e l'eccessiva esposizione a insulti infiammatori compromette le funzioni delle cellule staminali. Nel contesto della terapia genica con cellule staminali ematopoietiche (HSC), l'attenuazione delle risposte immunitarie innate indesiderate è fondamentale per preservare l'attecchimento e le capacità rigenerative delle HSC modificate dal gene al momento del trapianto. Abbiamo recentemente identificato un circuito trascrizionale che consente il controllo dipendente dal contesto dell'espressione genica infiammatoria nei macrofagi, che rappresenta un potenziale bersaglio per la modulazione immunitaria nella medicina rigenerativa. La prostaglandina E2 (PGE2), un lipide con ruoli chiave nello sviluppo e nel mantenimento delle HSC, limita l'attivazione dei macrofagi modulando le azioni del fattore di trascrizione MEF2A. In questo progetto, combineremo la genomica avanzata di massa e singola cellula con la proteomica, analisi computazionali, nonché esperimenti funzionali in cellule umane e in modelli murini, per definire i determinanti cellulari, molecolari e funzionali dell'asse PGE2-MEF2A durante omeostasi, danno e riparazione del midollo osseo. Il completamento con successo della ricerca proposta svelerà i principi regolatori e i meccanismi dell'omeostasi immunitaria dei tessuti. L'identificazione di bersagli e regolatori dell'asse PGE2-MEF2A consentirà il suo sfruttamento terapeutico per la terapia genica HSC e le applicazioni di medicina rigenerativa.

Disease Name:

Hematologic genetic diseases

Nome malattia:

Malattie genetiche ematologiche

Project number:

TGT22C17

149. FVIII REGULATES ENDOTHELIAL CELL FUNCTIONALITY

Olgasi C.^[1], Cucci A.^[1], Molineris I.^[2], Assanelli S.^[1], Anselmi F.^[2], Borsotti C.^[1], Sgromo C.^[1], Lauria A.^[2], Merlin S.^[1], Walker G.^[1], Capasso P.^[3], Lombardo A.^[3], Oliviero S.^[2], **Follenzi A.*^[1]**

^[1]University of Piemonte Orientale ~ Novara ~ Italy, ^[2]University of Torino ~ Torino ~ Italy, ^[3]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Haemophilia A (HA) is a rare bleeding disorder caused by factor 8 (F8) mutations. The reduction or lack of plasma FVIII causes prolonged bleedings episodes, either spontaneously or secondary to trauma, with clinical severity proportional to the degree of FVIII reduction¹. To date, there is no definitive cure for HA, with the current therapeutic practice being a replacement therapy of plasma-derived or recombinant human FVIII (rhFVIII) delivered on demand or as prophylaxis to prevent bleeding events². Despite the amelioration with replacement therapy, 20 to 40% of patients with the severe form of HA develop inhibitors making the treatment ineffective³⁻⁴. Clinical manifestations are spontaneous bleedings consisting primarily of hemarthrosis and intracranial haemorrhages (ICH). The ICHs represent the most serious event that can occur in HA patients resulting in 20% rates of mortality and disability⁵⁻⁷. The manifestation of ICH is often spontaneous, and it mainly occurs in patients that do not adhere to the prophylaxis regimen resulting in inadequate levels of blood FVIII⁸⁻⁹. To date, the correlation between FVIII and the impairment of vessel stability in HA patients is poorly understood. Interestingly, we and others have demonstrated that endothelial cells (ECs) are the main FVIII producers¹⁰⁻¹², however, an association between endothelial fragility and the absence of or low activity of FVIII has never been explored. Moreover, very little is known regarding the differences in the genetic profile between healthy and HA ECs that can be isolated from the peripheral blood, as blood outgrowth endothelial cells (BOECs)¹³, or differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs)¹⁴. Both EC models, once transduced with a lentiviral vector (LV) carrying the coagulation FVIII (LV-FVIII) and implanted into a prevascularized medical device were able to correct the bleeding phenotype of HA mice¹³⁻¹⁴. Therefore, based on the clinical observation of a general endothelial fragility in HA patients, we investigated the role of FVIII in the maintenance of EC stability by evaluating the differences in the functionality and the transcriptomic profile of healthy, HA, and LV-FVIII-transduced HA ECs using two EC models. We show that FVIII plays a role in EC functionality. ECs knockout generated by CRISPR/Cas9 and HA ECs showed alteration of vessel-formation, migration and vessel permeability. Importantly, the treatment with rhFVIII or by LV-FVIII rescued the impaired EC phenotype. The endothelial function of FVIII was confirmed in a mouse model of HA where the altered angiogenesis, extracellular matrix integrity and vessel permeability were rescued by ectopic FVIII. Transcriptomic profiles revealed that FVIII regulates the expression of endothelial basement membrane and extracellular matrix genes. Thus, lack of FVIII in HA patients impairs not only coagulation but also endothelial transcriptome predisposing patients to increased risk of trauma due to vessel fragility.

Il ruolo del FVIII nella funzionalità delle cellule endoteliali

L'emofilia A è una malattia rara causata dall'assenza del fattore VIII (FVIII), una proteina essenziale per la coagulazione. Non essendoci una cura definitiva per questa malattia, attualmente i pazienti ricevono una terapia con plasma derivati o FVIII ricombinante. L'assenza o la riduzione del FVIII nel sangue aumenta la possibilità di avere sanguinamenti in diverse parti del corpo che possono causare emorragie a livello articolare e/o intracraniche. Queste emorragie a livello del cervello avvengono con maggior frequenza nei bambini e nei pazienti che non aderiscono perfettamente alla profilassi.

Il nostro gruppo di ricerca e altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che il FVIII è maggiormente prodotto dalle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Tuttavia, si hanno ancora troppo poche informazioni circa la corretta funzionalità dei vasi nei pazienti emofilici. Abbiamo quindi deciso di valutare la permeabilità dei vasi sanguigni in topi emofilici rispetto a quelli sani riscontrando che i topi malati avevano vasi più permeabili. Per indagare ulteriormente l'effetto del FVIII in modelli

cellulari endoteliali, abbiamo isolato con un solo prelievo di sangue un tipo di cellule endoteliali da volontari sani e pazienti emofilici. Innanzitutto, abbiamo osservato una diversa funzionalità tra le cellule dei sani e quelle derivate da pazienti affetti da emofilia A. Infatti, le cellule endoteliali emofiliche non sono in grado di formare vasi stabili e organizzati come accade nei sani le cui cellule endoteliali formano vasi ben strutturati. Dopodiché, abbiamo modificato il DNA delle cellule sane ottenendo cellule che non esprimevano FVIII, simili a quelle emofiliche. Inoltre, anche le cellule emofiliche sono state modificate introducendo la forma corretta del gene del F8 generando così un modello simile a quello sano. Gli esperimenti su queste cellule modificate hanno ulteriormente dimostrato il ruolo centrale del FVIII nella stabilizzazione dei vasi: l'inserimento del FVIII in cellule emofiliche ha incrementato la loro funzionalità, mentre l'introduzione di mutazioni nel gene del F8 delle cellule sane ha fatto perdere la loro capacità di formare vasi stabili e funzionali.

Questi esperimenti dimostrano che la mancanza di FVIII nelle cellule endoteliali dei vasi non causa solo problemi a livello della coagulazione ma aumenta anche la fragilità dei vasi stessi.

Disease Name:

Hemophilia A

Nome malattia:

Emofilia A

Project number:

GGP19201

150. LONG TERM EFFECTIVENESS OF REPLACEMENT THERAPIES IN HEMOPHILIA: A MATTER OF SPECIFIC DENDRITIC CELL SUBSETS?

Gargaro M., Scalisi G., Manni G., Mencarelli G., Ricciuti D., Pieroni B., Sarnari F., Fallarino F.*

University of Perugia ~ Perugia ~ Italy

One of the challenging clinical complications for people with hemophilia continues to be the development of neutralizing alloantibodies to FVIII that render replacement therapies ineffective. In previous studies, we have shown that in patients with severe hemophilia A, the presence of anti-FVIII antibodies is associated with dysfunctional activation of the tryptophan metabolic enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1), which is highly expressed by dendritic cells (DCs). DCs are critical immune cells that regulate both innate and adaptive immune responses. They include the conventional subtypes cDC1, cDC2, and plasmacytoid DC (pDC).

Production of antibodies to FVIII can be also induced in preclinical animal models. Using a highly innovative approach in which FVIII was administered to genetically engineered mouse models lacking selected subsets of DCs, we found that the absence of cDCs resulted in complete abrogation of the FVIII antibody response. In contrast, depletion of pDCs or macrophages had no effect on the production of antibodies to FVIII.

Moreover, the production of anti-FVIII antibodies was not affected in mice lacking the cDC1 subset. However, in mice lacking the cDC2 subgroup, there was a strong suppression, suggesting an immunogenic role of this subset in priming follicular T helper cells and humoral immune response to FVIII.

We also showed that the administration of high doses CpG-ODNs prevented antibody development. Notably, CpG-mediated immunoprotective effects were markedly suppressed in mice lacking IDO1+ cDC1, suggesting a division of labor between two subsets of cDCs in promoting tolerance or immunity in hemophilia. Specifically, we have reported that cDC1 cells are an

important source of the immunoregulatory metabolite kynurenine (Kyn), an endogenous ligand of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). Accordingly, in vivo administration of Kyn in combination with FVIII in the same animal model, resulted in suppression of FVIII antibody response and follicular T helper cells in germinal centers. Conversely, the absence of AhR in cDC2 prevented the immunoregulatory effect of Kyn in vivo.

These results, used here as a model antigen, support the role of a division of labor of cDC subsets in accelerating tolerance or immunity to FVIII administration in vivo and suggest the possibility of new immunomodulatory technologies based on biologics transfer to provide solutions to one of the outstanding challenges that currently limit the effective use of novel therapies beyond a select group of patients

Efficacia delle terapie sostitutive nell'emofilia: ruolo di specific subsets di cellule dendritiche?

Una delle complicanze cliniche per le persone affette da emofilia continua ad essere lo sviluppo di alloanticorpi neutralizzanti contro il FVIII che rendono inefficaci le terapie sostitutive specialmente dopo un numero specifico di trattamenti. In studi precedenti, il nostro team ha dimostrato che nei pazienti con emofilia A grave, la presenza di anticorpi anti-FVIII è associata alla mancata attivazione dell'enzima indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO1), che è altamente espresso dalle cellule dendritiche (DC). Le DC sono importanti cellule che regolano le risposte immunitarie sia innate che adattative. Queste includono i sottotipi convenzionali cDC1, cDC2 e DC plasmacitoidi (pDC).

La produzione di anticorpi contro il FVIII può essere indotta anche in modelli animali preclinici. Per tale motivo, utilizzando un approccio altamente innovativo in cui il FVIII viene somministrato a modelli murini geneticamente modificati privi di specifiche sottopopolazioni di DC, abbiamo scoperto che l'assenza di cDC e soprattutto di un subset deputato al differenziamento delle cellule follicolari nei linfonodi, determina l'abrogazione completa della risposta anticorpale verso il FVIII. Allo stesso tempo, la deplezione di pDC o macrofagi non determina alcun effetto sulla produzione di anticorpi contro il FVIII.

Abbiamo anche dimostrato che la somministrazione di alte dosi di una piccola sequenza di DN ha impedito lo sviluppo di anticorpi e tale effetto protettivo richiede l'attività di IDO1 e cDC, suggerendo una divisione di lavoro tra sottogruppi di cDC nel promuovere la tolleranza o l'immunità nell'emofilia.

Nello specifico abbiamo scoperto che cDC esprimenti l'enzima IDO1 sono un'importante fonte di un metabolita con funzione immunoregolatoria chiamato chinurenina.

Questi risultati supportano il ruolo di una divisione di compiti fra sottopopolazioni di cDC nell'indurre la tolleranza o l'immunità verso il FVIII in vivo e suggeriscono la possibilità di nuove tecnologie immunomodulatorie basate sul trasferimento di metaboliti endogeni per fornire soluzioni a una delle sfide che attualmente limitano l'uso efficace di nuove terapie.

Disease Name:

Hemophilia A

Nome malattia:

Emofilia A

Project number:

GMR22T1081

151. EXPLORING THE ROLE OF MEDIATOR COMPLEX SUBUNIT 12-LIKE (MED12L) IN RARE MYELOID NEOPLASMS

Crisafulli L.^[1], Zampini M.^[2], Saba E.^[3], Riva E.^[2], Della Porta M.G.^[3], Ficara F.*^[1]

^[1]Milan Unit, CNR-IRGB ~ Milan ~ Italy, ^[2]IRCCS Humanitas Research Hospital ~ Rozzano (Milan) ~ Italy, ^[3]Department of Biomedical Sciences, Humanitas University ~ Pieve Emanuele (Milan) ~ Italy

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are rare heterogeneous diseases characterized by excessive production of platelets, as in the Essential Thrombocytemia (ET) subtype, or of erythrocytes, as in Polycythemia Vera (PV). MPN patients have increased risk of thrombotic events and of transformation to acute myeloid leukemia (AML). A frequent feature of MPN is the somatic phenotypic driver mutation V617F in the JAK2 gene, present in patient's hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC). Another group of rare heterogeneous blood disorders with a stem cell origin are myelodysplastic syndromes (MDS), characterized by ineffective hematopoiesis. Among MDS subtypes, MDS/MPN share with MPN the presence of the JAK2V617F mutation and of thrombocytemia.

In conditional JAK2V617F mice in which the stem cell transcription factor Pbx1 has been deleted, we showed that thrombocytemia does not develop, and erythrocytosis disappear with time (1). One of the genes downregulated in the absence of PBX1 is Med12L, which caught our attention for its high expression in normal HSPC and megakaryocytes (Mk) precursors and for its upregulation in Mk-Erythroid progenitors of two independent MPN murine models. We hypothesize that MED12L is involved in HSPC function and in Mk priming, and that its dysregulation, secondary to an established driver mutation, contribute to the phenotype of hematological malignancies with thrombocytemia, whose biology is still poorly understood.

We will study the function of MED12L in normal HSPC and in rare myeloid neoplasms by analyzing:

- (a) the phenotype of Med12L KO mice
- (b) the consequences of MED12L absence in a mouse model of MPN, after crossing MED12L KO mice with a JAK2V617F MPN model
- (c) the expression MED12L in HSPC from patients and the outcome of its inhibition.

Preliminary data obtained by RNA sequencing of CD34+ HSPCs purified from MDS patients indicate that, in a large portion of subjects, the expression of MED12L is higher compared to that found in normal controls or in patients who underwent AML evolution. Importantly, we found a positive correlation between MED12L expression and platelet counts, especially in the MDS low-risk subgroup. The association is stronger between the highest MED12L levels and severe thrombocytosis. Last, we observed a positive correlation between the expression of MED12L and hemoglobin level, mainly in the MDS high-risk subgroup.

MED12L is a component of the Mediator complex, which acts as a bridge that transfer information from gene-specific transcription factors at enhancers to the RNA pol II machinery. It is composed of up to 30 proteins, some of them having mutually exclusive paralogs including MED12L, whose function remains obscure. If the hypothesis of a role for MED12L in MPN and MDS subtypes is confirmed, this protein might represent a novel biomarker to further stratifying these heterogeneous patients and personalize their therapeutic approach or highlight a new oncogenic pathway to be targeted.

Studio del ruolo della proteina MED12L (analogo alla subunità 12 del complesso Mediator) in neoplasie mieloidi rare

Le malattie oggetto del nostro studio sono forme rare di neoplasie mieloidi, tumori del sangue che hanno origine nel midollo osseo. Di queste fanno parte sia le neoplasie mieloproliferative, nelle

quali il midollo produce un eccesso di alcuni tipi di cellule del sangue o di piastrine, come avviene nella Trombocitemia Essenziale (ET), che le mielodisplasie, dove al contrario il midollo non produce a sufficienza globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Esistono tuttavia forme rare di mielodisplasie, le MPN/MDS, nelle quali c'è un eccesso di piastrine come nelle ET, e che come le ET hanno una forma alterata del gene JAK2. Si tratta in generale di malattie per le quali le terapie disponibili tengono sotto controllo alcuni sintomi senza però ottenere una guarigione, e spesso non impediscono il rischio di trombotosi o di trasformazione in leucemia. Il nostro studio ha l'obiettivo di comprendere se una molecola non studiata finora, chiamata MED12L, svolge un ruolo importante nella formazione delle cellule del sangue e delle piastrine a partire dalle cellule staminali del midollo osseo, da cui tutte le cellule del sangue sono continuamente generate. Da nostri studi precedenti sospettiamo che ci sia una quantità di MED12L superiore alla norma nelle cellule staminali di pazienti con malattie mieloproliferative o con la mielodisplasia MPN/MDS, probabilmente in conseguenza della mutazione in JAK2. Con il nostro studio vogliamo confermare questa osservazione su un numero più elevato di pazienti. Dati preliminari indicano che, nelle cellule midollari più immature e non ancora differenziate di gran parte dei pazienti con MDS, c'è una quantità più elevata di MED12L rispetto a cellule di controlli privi di malattie ematologiche o rispetto a pazienti con MDS trasformati in leucemia. Abbiamo inoltre riscontrato una forte correlazione tra il livello di MED12L e le conte piastriniche, con livelli più alti di MED12L associati a casi con trombocitemia, in particolare in alcuni gruppi di pazienti. Per scoprire se MED12L è parzialmente responsabile dell'aumento di piastrine tipico di queste malattie e se la sua eliminazione ne possa modificare il decorso ci avvarremo di modelli animali, compreso un modello sperimentale di neoplasia mieloproliferativa. L'obiettivo finale è individuare una o più nuove molecole da colpire con farmaci innovativi, o scoprire molecole che funzionino da sentinelle per individuare prontamente i pazienti a più alto rischio che necessitano di cure personalizzate.

Disease Name:

Myeloproliferative neoplasm

Nome malattia:

Neoplasie mieloidi

Project number:

GJC21072

152. THE FC RECEPTOR CD32 IS A SPECIFIC CELL-SURFACE MARKER FOR ISOLATING HUMAN HEMOGENIC ENDOTHELIAL CELLS

Ditadi A.*, Scarfò R.

SR-TIGET ~ Milan ~ Italy

The generation of hematopoietic stem cells (HSCs) from human pluripotent stem cells (hPSCs) is a major goal for regenerative medicine. In fact, HSCs transplant is an effective treatment for hematological disorders, but both the paucity of suitably matched donor cells and the need of high number of cells remain a clinical bottleneck. hPSCs would represent a novel, potentially unlimited, source of patient-specific HSCs. However, the robust de novo generation of HSCs remains unrealized, underscoring our lack of understanding of the biological processes leading to blood formation.

During embryonic development, blood cells emerge from a subset of specialized endothelial cells, named hemogenic endothelial cells (HECs), via a process known as endothelial-to-hematopoietic transition (EHT). A thorough characterization of HECs is essential to guide the efforts to derive this population from hPSCs. However, current known markers used to isolate HECs are insufficient as

they also enrich for arterial endothelial cells that are associated with HECs. Using transcriptomic analysis of 28-32-day human embryos, a developmental stage characterized by active EHT, we have identified the Fc receptor FCGR2B as a putative marker of embryonic HECs. Functional ex vivo analyses confirmed that multilineage hematopoietic potential is highly enriched in CD32+ endothelial cells isolated from the aorta-gonad-mesonephros region and yolk sac of human embryos. In addition, CD32 emerged as selective marker for hPSC-derived HECs across different hematopoietic programs. Remarkably, our analyses showed that CD32 expression enriches for cells with hemogenic potential with a higher specificity for hPSC-derived HECs than other known HEC markers. These findings provide a simple method for isolating HECs from human embryos and hPSC cultures, allowing its molecular characterization as well as the efficient generation of hematopoietic cells in vitro.

La generazione di cellule staminali ematopoietiche (HSC) da cellule staminali pluripotenti umane (hPSC) è un obiettivo fondamentale per la medicina rigenerativa. Seppur il trapianto di HSC sia essenziale per il trattamento di disturbi ematologici, la scarsità di cellule donatrici compatibili e la necessità di trapiantarne un numero elevato rendono questa terapia difficile da attuare. Al contrario, le hPSC rappresenterebbero una fonte nuova, potenzialmente illimitata, di HSC specifiche per il paziente. Tuttavia, un'efficace generazione di HSC da hPSC è, ad oggi, utopica a causa della scarsa comprensione dei processi biologici che portano alla formazione del sangue. Durante lo sviluppo embrionale, le cellule del sangue emergono da una specifica popolazione di cellule endoteliali (ossia formanti i vasi sanguigni), denominate cellule endoteliali emogeniche (HEC, in grado di generare cellule del sangue), attraverso un processo noto come transizione endoteliale-ematopoietica (EHT). Una caratterizzazione approfondita delle HEC è essenziale per derivare questa popolazione dalle hPSC e dunque generare sangue in laboratorio. Tuttavia, i marcatori noti utilizzati per isolare le HEC sono insufficienti a questo scopo, in quanto arricchiscono non solo queste ultime ma anche altri tipi di cellule endoteliali a loro associate eppure prive di potenziale emogenico. L'analisi di embrioni umani di 28-32 giorni, una fase di sviluppo caratterizzata da EHT attivo, ha permesso di identificare il recettore FCGR2B (o CD32) come un marcatore di HEC. Infatti, le cellule endoteliali che esprimono CD32 sono in grado di generare le cellule del sangue sia quando isolate da specifiche regioni dell'embrione umano sia da hPSC. Inoltre, le nostre analisi hanno mostrato che l'espressione di CD32 permette di arricchire HECs con altissima specificità, maggiore di quella di altri marcatori noti. Questi risultati forniscono un metodo semplice per isolare le HEC da embrioni umani e colture di hPSC, consentendo la loro caratterizzazione molecolare e la generazione efficiente di cellule del sangue in laboratorio.

Disease Name:

SCID-X1

Nome malattia:

SCID-X1

Project number:

TGT22C06

153. RIBOSOMAL PATHOLOGIES: MECHANISTIC THERAPY OF SHWACHMAN-DIAMOND SYNDROME AND PREVENTION OF MALIGNANT COMPLICATIONS DUE TO STEM CELL MANIPULATION

Giacomo D.A.^[1], Alessandra S.^[1], Giada M.*^[1], Sara R.^[1], Paolo R.^[1], Annarita M.^[1], Stefania O.^[1], Stefano B.^[2]

^[1]INGM ~ Milano ~ Italy, ^[2]Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy

Shwachman Diamond Syndrome (SDS) is a monogenic disease caused in most cases by loss-of-function mutations of SBDS protein. SDS has variable symptoms including exocrine pancreatic insufficiency and growth defects, bone marrow alterations with neutropenia, susceptibility to infections and increased risk for malignant transformation, in particular, development of acute myelogenous leukemia (AML). Importantly, deficiency of SBDS causes a reduced release of eIF6 from 60S ribosomal subunits and eIF6 point mutants rescue the deficit induced by SBDS. In short, drugs hitting eIF6 activity may potentially rescue SDS phenotype. Our lab has a strong background on eIF6 biology and has recently developed a new model for culturing hemopoietic cells. Here we describe our efforts to exploit this know-how on the quest for an SDS cure. The first goal of the project is to manipulate eIF6 activity in order to solve the SDS phenotype. As a first part of this work, we a) modelled the eIF6 N106S mutation in HEK293 cells by the prime editing technology. These cells are viable and grow normally. Next, we will analyse to which extent N106 mutation restores the SBDS loss-of-function phenotype, and whether it confers unwanted biological effects, such as increased tumorigenesis. This part of our work will validate the safety and strength of the approach of modifying eIF6 function. In addition, we b) found three small molecules that modulate eIF6 binding to the 60S. In vitro experiments confirm that these molecules modify translational efficiency. Further characterization is in progress and pro and cons will be outlined. The second goal is the correction and tumorigenicity testing of SDS hemopoietic cells. In this context, we have developed a system for long term culture of hemopoietic stem cells and their testing for unwanted oncogenic mutations. The state of the art of the system will be presented. In conclusion, we suggest that multiple strategies aimed at curing the SDS phenotype may lead to the rapid identification of fruitful therapeutic avenues. Current limits of our strategies will be described, too.

Le cosiddette ribosomopatie sono malattie monogeniche ereditarie caratterizzate dalla perdita di funzionalità dei ribosomi, le fabbriche intracellulari dedicate alla sintesi delle proteine. Le ribosomopatie si presentano con sintomatologie a carico di diversi tessuti, tra i quali una ridotta funzionalità del midollo osseo con conseguente carenza di neutrofili, ed un rischio elevato di tumori della linea emopoietica. La sindrome di Schwachman-

Diamond è causata dalla perdita di funzione del gene SDS. La perdita parziale del gene SDS causa una ridotta funzionalità dei ribosomi. Un numero rilevante di studi genetici e cellulari ha dimostrato in maniera

inequivocabile che la modificazione della attività biochimica della proteina eIF6 può "curare" i difetti causati dalla perdita di SDS. Il nostro laboratorio ha prodotto negli ultimi anni diverse molecole in grado di modificare la funzione di eIF6 e, potenzialmente, ripristinare la funzione del gene SDS. In questo studio proponiamo una analisi completa dei costi-benefici della manipolazione della attività molecolare di eIF6

attraverso i composti sviluppati nel laboratorio. La analisi degli effetti molecolari dei modulatori di eIF6 sarà accompagnata dalla verifica di eventuali strategie alternative che mirano a recuperare la funzionalità della proteina SDS. Infine, verificheremo se la strategia di modulazione della attività di eIF6 è in grado di ristabilire la normale funzionalità delle cellule staminali del midollo osseo, senza causare effetti collaterali. Nel complesso il

nostro studio potrebbe porre le basi per un intervento terapeutico razionale e personalizzato per la sindrome di Schwachman-Diamond.

Disease Name:

Shwachman-Diamond Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Shwachman-Diamond

Project number:

GGP20008

154. IDENTIFICATION OF DRUGGABLE PRO-RESOLVING MECHANISMS IN SICKLE CELL DISEASE

Federti E.*^[1], Mattè A.^[1], Recchiuti A.^[2], Mattoscio D.^[2], De Franceschi L.^[1]

^[1]Università di Verona ~ Verona ~ Italy, ^[2]Università di Chieti ~ Chieti ~ Italy

Sickle cell disease (SCD) is a monogenic rare hereditary red cell disorder. Cardiovascular disease has been recognized as the main cause of death in adult with SCD. We used humanized mouse model for SCD on normoxia or after exposure to hypoxia/reoxygenation (H/R) stress, a model of sickle cell related vaso-occlusive crisis. The proteomic analysis of hearts from mice exposed to H/R identified 139 proteins differently expressed in SCD mice vs healthy animals. The identified proteins are involved in anti-oxidant, pro-inflammatory or pro-fibrotic pathways, under the control of NF-κB p65 or Nrf2 transcriptional factors. Indeed, in hearts from SCD mice exposed to H/R, we found activation of both transcriptional factors when compared to vehicle treated animals. We sought to take advantage of our previous study with 17R-RvD1, showing its protective role against sickle cell related lung and kidney injury (Matte A et al Blood 2019). Treatment with 17R-RvD1 (100 ng/mouse) prevented the hypoxia induced of NF-κB p65. This was associated with reduced expression of markers of inflammatory vasculopathy and vascular dysfunction and extracellular matrix deposition. Noteworthy, we also found that RvD1 treatment modified the miRNAs signature in hearts of SS H/R mice, significantly upregulating expression of miRNAs let-7c-5p, miR-181b-5p, miR-125a-5p, and miR-149-5p. Bioinformatics analysis revealed that RvD1-increased miRNAs diminished proteins involved in heart hypertrophy, angiogenesis, and fibrosis in agreement with the proteomics analysis. Collectively our data indicate that the unbalance between pro-inflammatory and pro-resolving events is important in the pathogenesis of sickle cell related cardiomyopathy.

IDENTIFICAZIONE DEI MECCANISMI PRO-RISOLUTIVI CHE CARATTERIZZANO L'ANEMIA FALCIFORME DA SFRUTTARE COME POTENZIALI TARGET TERAPEUTICI.

La drepanocitosi o falcemia è una rara malattia ereditaria invalidante dei globuli rossi, caratterizzata dalla produzione di emoglobina anomala. Le persone con drepanocitosi hanno ricorrenti episodi di occlusioni del flusso sanguigno che portano a danni d'organo gravi e cardiopatie che influiscono profondamente sulla qualità e durata della vita. Sono quindi necessari approcci terapeutici nuovi e alternativi per ridurre l'impatto di infiammazione e malattia cardiovascolare in questi pazienti. Per raggiungere questo obiettivo abbiamo utilizzato un modello murino di anemia falciforme che abbiamo studiato sia in normossia che dopo stress di ipossia/riossigenazione (modello che mima le crisi vaso occlusive tipiche dei pazienti falcemici). L'analisi proteomica ha identificato 139 proteine differenzialmente espresse a livello cardiaco in topi falcemici rispetto a topi controllo. Le proteine identificate sono coinvolte in vie funzionali antiossidanti, pro-infiammatorie e pro-fibrotiche. In modo analogo abbiamo analizzato anche un pannello allargato di miRNA e abbiamo sovrapposto l'analisi proteomica e quella dei miRNA

identificando alcuni target funzionali chiave nel danno cardiaco relato alla drepanocitosi. Abbiamo trattato i topi falcemici con le Resolvine, piccoli lipidi specializzati fisiologicamente prodotti per “controllare” l’infiammazione e prevenire i danni d’organo. E’ emerso che il trattamento con Resolvine può prevenire l’anomala attivazione di vie di segnale pro-infiammatorio, pro- fibrotic e di neoangiogenesi. I dati che abbiamo ottenuto finora indicano che lo sbilanciamento fra infiammazione ed eventi pro-risolutivi nella malattia cardiovascolare falcemica è correggibile dal trattamento con Resolvine, che quindi possono essere proposte come una nuova opzione terapeutica per prevenire/ridurre il danno cardiaco falcemico-relato e l’evoluzione verso la cardiopatia ipertrofica.

Disease Name:

Sickle Cell Disease

Nome malattia:

Anemia Falciforme

Project number:

GGP20116

155. IMPACT OF A NOVEL VARIANT OF THE BETA ISOFORM OF THE TBXA2R GENE ASSOCIATED WITH A HEMORRHAGIC DISORDER ON PLATELET AND ENDOTHELIAL FUNCTION

Bury L., Falcinelli E., Mezzasoma A.M., Tondi F.*, Gresele P.

Università di Perugia, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Sezione di Medicina Interna e Cardiovascolare ~ Perugia ~ Italy

The thromboxane A2 receptor (TP) plays an essential role in hemostasis by binding thromboxane A2 (TXA2), a platelet agonist and a vasoconstrictor which also regulates endothelial function. There are two isoforms of the receptor, TP α and TP β , generated by alternative splicing from the TBXA2R gene which show different coupling to G-proteins. While the expression and function of TP α in platelets is well established, that of TP β is debated. TP-deficiency is an autosomal dominant bleeding disorder caused by variants in TBXA2R. Only 6 variants in few families have been described making this disorder rare and poorly studied. Moreover, the severity of bleeding differs among patients with the same gene variant for unclear reasons.

We recently found a novel TBXA2R variant in a woman with a lifelong bleeding diathesis. Patient platelets showed defective response to arachidonic acid, U46619 and U44069, two stable TXA2 analogues, at light transmission aggregometry. Secretion of granules was defective, while granule content was normal. These characteristics oriented towards a TP receptor defect, and in order to confirm the diagnosis we performed PCR and Sanger sequencing of the TBXA2R gene. We found a heterozygous A>T substitution at genomic DNA position 11765 (g.A11765T), a variant not reported in the ExAC nor in the 1000G. This variant has differential effects on the two TP isoforms: in TP α the variant hits the 3' UTR without changes in the aminoacid sequence of TP α ; in TP β the variant position corresponds to the alternative splice site, and the A>T substitution may lead to the loss of TP β . Accordingly, we found 50% expression of TP β transcript and protein in patient platelets.

Aim of the present project is to shed light on the role of the TBXA2R gene variant as the cause of the rare inherited hemorrhagic disorder TP-deficiency and to elucidate the function of TP β in platelets and endothelial cells.

In particular we will:

- investigate the function of the TP receptor encoded by a novel gene variant, assessing its ability

to bind ligands and to transduce signals

- investigate the ability of the two TP α to generate dimers with the normal or mutant TP β and to undergo internalization
- assess the possible co-inheritance of variants in other genes involved in platelet or in coagulation regulation to explaining the variability of the clinical phenotype
- shed light on the impact of TBXA2R variants on endothelial cells function in patient-derived endothelial colony forming cells (ECFCs)

The knowledge deriving from these studies may on one side set the basis for the development of personalized treatment approaches for this rare inherited bleeding disorder and on the other open the way to the identification of TP β as a new target for antiplatelet therapy for atherothrombotic disease.

Impatto di una nuova variante dell'isoforma beta del gene TBXA2R associata ad un disordine della funzionalità piastrinica ed endoteliale

I disordini emorragici ereditari sono malattie genetiche che si manifestano clinicamente con sanguinamenti, spontanei o provocati, talvolta gravi e che peggiorano la qualità di vita dei pazienti. Il trombossano è una molecola che agisce da agonista delle piastrine, le cellule che assicurano la funzione emostatica, interagendo con il suo recettore sulla superficie delle piastrine ed attivandole, garantendo così il loro corretto funzionamento e l'arresto di eventuali emorragie. Il difetto del recettore del trombossano è un disordine emorragico ereditario molto raro e di conseguenza poco studiato causato da mutazioni del gene TBXA2R. La sua diagnosi richiede test di laboratorio complessi e non è ancora chiaro se la presenza di una mutazione di TBXA2R sia sufficiente per determinare la tendenza emorragica dei pazienti. Inoltre, esistono due sottotipi del recettore del trombossano, TP α e TP β , e non si sa se le piastrine posseggano entrambe le forme o solo TP α . Infine, il recettore del trombossano è presente e svolge un ruolo fondamentale anche nelle cellule endoteliali, cellule che tappezzano l'interno dei nostri vasi sanguigni, ma nessuno ha mai studiato se mutazioni del recettore possano danneggiare anche queste cellule. Partendo dallo studio di una famiglia da noi identificata affetta da questa rara malattia genetica, il nostro progetto ha lo scopo di aumentare le conoscenze attuali sul difetto del recettore del trombossano migliorandone la diagnosi, identificando eventuali altre mutazioni genetiche associate che possano contribuire alla tendenza emorragica dei pazienti, e determinando se il sottotipo TP β del recettore è espresso nelle piastrine. Inoltre studieremo anche se le mutazioni del recettore del trombossano possono avere un impatto sulle cellule endoteliali potenzialmente contribuendo così al sanguinamento dei pazienti.

Disease Name:

Thromboxane receptor defect

Nome malattia:

Difetto del recettore del trombossano

Project number:

GMR22T1086

156. HUMAN HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELL TRAFFICKING AND CLONAL TRACKING

Quaranta P.*^[1], Basso--Ricci L.^[1], Jofra Hernandez R.^[1], Pacini G.^[1], Seffin L.^[1], Rilievo A.A.^[1], Barcella M.^[1], Monti I.^[1], Giannelli S.^[1], Darin S.^[2], Gattillo S.^[3], Di Micco R.^[1], Ostuni R.^[1], Ciceri F.^[4], Montini E.^[1], Gentner B.^[1], Bernardo M.E.^[1], Merelli I.^[1], Ferrua F.^[1], Cicalese M.P.^[1], Scala S.^[1], Aiuti A.^[1]

^[1]SR-Tiget ~ Milan ~ Italy, ^[2]Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[3]Immuno-hematology and transfusion medicine Unit, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[4]Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells (HSPC) mainly reside in the bone marrow (BM) but few circulating cells (cHSPC) are found in peripheral blood (PB) and their amount is increased by mobilizing agents for gene therapy (GT) purposes. Combining phenotypic and functional assays with single-cell transcriptome profiling and integration site analyses, we are studying the behavior of human resident, circulating and mobilized HSPC.

By evaluating the reconstitution kinetic after GT in Wiskott-Aldrich Syndrome patients we found that mobilized peripheral blood(MPB)-HSPC allowed faster neutrophil and platelet recovery, higher number of engrafted clones and increased gene correction in the myeloid lineage, as compared to BM HSPC. This correlated with higher amount of myeloid and primitive progenitors contained in MPB HSPC. Finally, BM- and MPB-GT patients display distinct kinetics of hematopoietic recovery, but similar long-term reconstitution.

We assessed HSPC mobilization kinetics in patients with different inherited disorders as well as adult healthy donors(HD) undergoing mobilization with G-CSF (G) with or without Plerixafor (G+P). Primitive and myeloid progenitors showed the highest mobilization capability after G, while all HSPC mobilized after administration of P. This subset-specific mobilization propensity after G inversely correlated with HSPC CXCR4 expression. By reproducing patients' mobilization protocol in xenotransplanted mice we are assessing the impact of CXCR4 expression on the distinct HSPC mobilization kinetics observed.

Finally, we found that cHSPC and BM-HSPC display distinct compositions but comparable BM homing after xenotransplantation. Moreover, the number of both total and primitive cHSPC is high in young infants, suggesting the possible exploitation of cHSPC as alternative stem cell source. We are currently investigating the molecular mechanisms of HSPC trafficking and evaluating the capability of cHSPC to be transduced and expanded in vitro.

Tracking clonale del ricircolo delle cellule staminali/progenitrici ematopoietiche umane

Le cellule staminali/progenitrici ematopoietiche umane (HSPC) risiedono principalmente nel midollo osseo (BM) ma poche cellule circolanti (cHSPC) si trovano nel sangue periferico (PB) e la loro quantità può essere aumentata utilizzando agenti mobilizzanti al fine di effettuare la terapia genica (GT). Combinando analisi di caratterizzazione fenotipica e funzionale con studi trascrizionali a singola cellula e tracking clonale dei siti di integrazione, stiamo studiando il comportamento di HSPC residenti nel BM, circolanti e mobilizzate nei soggetti umani.

Studiando le dinamiche di ricostituzione dopo GT nei pazienti con sindrome di Wiskott-Aldrich, abbiamo scoperto che le HSPC di sangue periferico mobilizzato (MPB) consentono di avere un recupero più rapido del numero di neutrofili e piastrine, un numero maggiore di cloni attecchiti e una maggiore correzione genica nelle popolazioni mieloidi, rispetto alle HSPC di BM. Ciò correla a una maggiore quantità di progenitori mieloidi e primitivi contenuti nelle HSPC di MPB, il che implica che la composizione iniziale di HSPC nel prodotto di infusione ha un impatto importante sull'esito della GT.

Abbiamo valutato la cinetica di mobilizzazione dell'HSPC in pazienti con diverse malattie ereditarie

e in donatori adulti sani (HD) sottoposti a mobilizzazione con G-CSF (G) con o senza Plerixafor (G+P). I progenitori primitivi e mieloidi hanno mostrato la più alta capacità di mobilizzazione dopo G, mentre tutti le sottopopolazioni di HSPC vengono mobilizzate dopo la somministrazione di P. Questa propensione alla mobilizzazione specifica delle sottopopolazioni dopo G è inversamente correlata all'espressione della molecola CXCR4 sulla superficie delle HSPC. Riproducendo il protocollo di mobilizzazione dei pazienti nei topi xenotrapiantati stiamo valutando l'impatto dell'espressione di CXCR4 sulle diverse cinetiche di mobilizzazione delle HSPC.

Infine, abbiamo scoperto che cHSPC e BM-HSPC mostrano composizioni distinte ma un simile potenziale di homing e differenziamento dopo xenotrapianto. Inoltre, il numero di sottopopolazioni di HSPC circolanti, incluse quelle più primitive, nel PB è elevato nei bambini piccoli, suggerendo il possibile utilizzo di cHSPC come fonte alternativa di cellule staminali. Attualmente stiamo studiando i meccanismi molecolari che modulano il traffico di HSPC e stiamo valutando la capacità di cHSPC di essere trasdotte ed espanse in vitro.

Disease Name:

Wiskott-Aldrich Syndrome; ADA-SCID; Metachromatic Leukodystrophy; Mucopolysaccharidosis I (Hurler syndrome)

Nome malattia:

Sindrome Wiskott-Aldrich; ADA-SCID; Leucodistrofia Metacromatica; Mucopolisaccaridosi tipo I (sindrome di Hurler)

Project number:

TGT22C01

157. DECONVOLUTING THE DYNAMICS OF HEMATOPOIETIC RECONSTITUTION IN GENE THERAPY PATIENTS

Calabria A.^[1], Spinozzi G.^[1], Cesana D.^[1], Benedicenti F.^[1], Pais G.^[1], Scala S.^[1], Lidonnici M.R.^[1], Scaramuzza S.^[1], Albertini A.^[1], Esposito S.^[1], De Mattia F.^[1], Canarutto D.^[1], Tucci F.^[1], Omrani M.^[1], Dionisio F.^[1], Giannelli S.^[1], Markt S.^[1], Calbi V.^[1], Ferrua F.^[1], Gentner B.^[1], Ciceri F.^[2], Naldini L.^[1], Ferrari G.^[1], Aiuti A.^[1], Montini E.^{*[1]}

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ Milan ~ Italy, ^[2]Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

In Lentiviral Vector (LV) -based Hematopoietic Stem Progenitor Cell (HSPC) gene therapy (GT), transplantation of genetically modified HSPCs results in the full reconstitution of the patients' hematopoietic system and provides therapeutic benefit in a variety of genetic diseases.

However, it is still unclear how the underlying genetic disease, as well as other factors, may impact the reconstitution process, lineage specification and patients' safety.

Here we analyzed the clonal repertoire and dynamics of hematopoietic reconstitution by studying >4 million vector integration sites, a surrogate of clonal identity, from purified myeloid, lymphoid, erythroid cell lineages and HSPCs from 53 patients treated by lentiviral-based HSPC-GT for metachromatic leukodystrophy (MLD) - a neurodegenerative lysosomal storage disorder, Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) - an immunodeficiency with thrombocytopenia and β -thalassemia (β -Thal) - a hemoglobinopathy.

All patients showed a polyclonal repertoire without signs of insertional mutagenesis and had an estimated number of active HSPCs over time ranging from 770 to 35,000 and remained stable long-term. A large fraction of clones estimated in the early phase were exhausted within 12 months and were replaced by a smaller, yet substantial, number of long-term IS stably sustaining steady-state hematopoiesis.

About 50% of hematopoietic clones had multilineage potential, in all disease conditions, while the remaining clones showed a preferential lineage output and long-term lineage commitment which was specific to the disease condition: MLD patients showed a long-term commitment towards myeloid lineages, while in patients treated for WAS had a preferential output and commitment towards lymphoid lineages and β -Thal for erythroid lineages.

Our results showed for the first time that the long-term output as well as the lineage commitment of HSPCs is strongly modulated by the patients' genetic background to better compensate for the demands posed by the specific clinical condition.

Deconvoluzione delle dinamiche della ricostituzione ematopoietica in pazienti di terapia genica

Il trapianto autologo di cellule staminali e progenitrici ematopoietiche (CSPE) geneticamente modificate con vettori lentivirali (VL) ha fornito benefici terapeutici in una varietà di malattie genetiche.

Tuttavia, non è ancora chiaro in che modo la malattia genetica, così come altri fattori, possa influire sul processo di ricostituzione ematopoietica, sulla specificazione del lignaggio e sulla sicurezza dei pazienti.

Qui abbiamo analizzato il repertorio clonale e la dinamica della ricostituzione ematopoietica studiando >4 milioni di siti di integrazione di VL, un surrogato dell'identità clonale, da cellule mieloidi, linfoidi, eritroidi purificate e CSPE isolate da 53 pazienti trattati per la terapia della leucodistrofia metacromatica (LDM) - un disturbo neurodegenerativo da accumulo lisosomiale, sindrome di Wiskott-Aldrich (SWA) - un'immunodeficienza con trombocitopenia e β -talassemia (β -Tal) - un'emoglobinopatia.

Tutti i pazienti hanno mostrato un repertorio policlonale senza segni di mutagenesi inserzionale e con un numero stimato di CSPE attive compreso tra 770 e 35.000. Una frazione di cloni stimati nella fase iniziale della ricostituzione ematopoietica è scomparsa entro i 12 mesi ed è stata sostituita da un numero minore di cloni capaci di sostenere stabilmente l'ematopoiesi a lungo termine.

Circa il 50% dei cloni ematopoietici ha mostrato la capacità di differenziare nei diversi lignaggi ematopoietici indipendentemente dalla condizione patologica, mentre i restanti cloni hanno mostrato una preferenza a differenziare in uno specifico lignaggio a lungo termine e che era specifico per la condizione della malattia: i pazienti LDM hanno mostrato una tendenza a differenziare in modo costante verso i lignaggi mieloidi, mentre nei pazienti SWA hanno mostrato una preferenza a differenziare verso i lignaggi linfoidi e β -Tal per i lignaggi eritroidi.

I nostri risultati indicano per la prima volta che l'attività delle CSPE è fortemente modulata dalla malattia genetica dei pazienti per compensare al meglio le esigenze poste dalla specifica condizione clinica.

Disease Name:

Wiskott-Aldrich Syndrome; beta-thalassemia; Metachromatic Leukodystrophy

Nome malattia:

Sindrome Wiskott-Aldrich; beta-talassemia; Leucodistrofia Metacromatica

Project number:

TGT22C14

Genetic hepatic disease

158. AGE OF ADMINISTRATION IMPACTS THE EFFICIENCY OF LENTIVIRAL VECTOR-MEDIATED HEPATOCYTE TRANSDUCTION IN VIVO AND ITS DISTRIBUTION IN THE LIVER LOBULE

Starinieri F.*^[1], Milani M.^[1], Beretta S.^[1], Canepari C.^[1], Simoni C.^[1], Fabiano A.^[1], Cammarota E.^[2], Biffi M.^[1], Russo F.^[1], Merelli I.^[1], Cantore A.^[1]

^[1]San Raffaele - Telethon Institute for Gene Therapy ~ Milan ~ Italy, ^[2]IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

The liver is an attractive target organ for in vivo gene therapy since it offers the possibility to treat metabolic and coagulation disorders. We previously showed efficient gene transfer to hepatocytes of mice, dogs and non-human primates by intravenous (i.v.) delivery of lentiviral vectors (LV), achieving stable clotting factor expression in animal models of hemophilia. Here we investigated LV-based liver gene therapy in newborn and juvenile mice, towards potential application to pediatric patients. I.v. administration to mice at post-natal day 1, week 2 or week 8 (adults) of LV expressing coagulation factor IX (FIX), led to higher FIX output in young-treated mice compared to adults. We observed higher transduction of hepatocytes in young-treated mice, paralleled by a reduced vector uptake by non-parenchymal cells. Moreover, we observed preferential transduction of central area in young-treated mice and of portal area in adult-treated mice. We performed spatial transcriptomics of livers of young and adult mice and observed that in newborn mice almost all hepatocytes displayed a transcriptional profile typical of the peri-portal zone, lacking a central signature, which appeared later in time. Adult central hepatocytes showed higher expression of proteasome-related genes, a possible cell-intrinsic factor restricting LV transduction. Indeed, proteasome inhibition by bortezomib has been shown to increase LV transduction in hematopoietic stem cells. Thus, we administered bortezomib to adult mice before LV administration and observed increased and homogeneous liver transduction compared to LV-only treated mice, indicating that proteasome is a major determinant of portal transduction bias in adult mice. Overall, our results indicate that LV-based liver gene therapy is more efficient in young mice, and that age at treatment impacts on LV transduction efficiency and spatial distribution of transduced hepatocytes and transgene output.

L'età di somministrazione di vettori lentivirali influenza l'efficienza del trasferimento genico e la distribuzione del vettore nel lobulo epatico

Il fegato è un organo bersaglio interessante per la terapia genica in vivo, poiché offre la possibilità di trattare disturbi metabolici e della coagulazione. In precedenza abbiamo dimostrato l'efficacia del trasferimento genico negli epatociti di topi, cani e scimmie mediante somministrazione endovenosa di vettori lentivirali (LV), ottenendo l'espressione stabile dei fattori di coagulazione in modelli animali di emofilia. Qui abbiamo studiato la terapia genica diretta al fegato basata su LV in topi giovani, in vista di una potenziale applicazione nei pazienti pediatrici. La somministrazione per via endovenosa in topi giovani di LV che esprimono il fattore IX della coagulazione (FIX) ha portato a una maggiore produzione di FIX rispetto agli adulti. Abbiamo osservato un maggior trasferimento genico negli epatociti dei topi giovani, insieme a una ridotta intercettazione del vettore da parte delle cellule non parenchimali. Inoltre, abbiamo osservato che LV raggiunge preferenzialmente l'area centrale del lobulo epatico nei topi giovani, e quella portale nei topi adulti. Tramite analisi di trascrittomico spaziale di fegati di topi giovani e adulti abbiamo osservato che nei topi giovani quasi tutti gli epatociti mostrano le caratteristiche delle cellule dell'area portale, e mancano quelle con le caratteristiche dell'area centrale, che appare più tardi nel tempo. Gli epatociti centrali adulti mostrano una maggiore espressione di geni legati al proteasoma, un possibile fattore intrinseco

alla cellula che limita il trasferimento genico di LV. In effetti, è stato dimostrato che l'inibizione farmacologica del proteasoma mediante bortezomib aumenta il trasferimento genico nelle cellule staminali ematopoietiche. Pertanto, abbiamo somministrato bortezomib a topi adulti prima della somministrazione di LV e abbiamo osservato un trasferimento genico maggiore e più omogeneo rispetto ai topi trattati solo con LV, indicando che il proteasoma è uno dei fattori principali che determinano un trasferimento genico non omogenea nel lobulo epatico dei topi adulti. Nel complesso, i nostri risultati indicano che la terapia genica diretta al fegato basata su LV è più efficiente nei topi giovani e che l'età al momento del trattamento influisce sull'efficienza del trasferimento genico da parte di LV, sulla distribuzione spaziale degli epatociti trasdotti e sul livello di secrezione di proteina.

Disease Name:

Hemophilia B

Nome malattia:

Emofilia B

Project number:

TGT22C04

159. MOLECULAR MECHANISMS COORDINATING MEMBRANE TRAFFICKING AND ION TRANSPORT IN WILSON DISEASE

Polishchuk E.*^[1], Petruzzelli R.^[1], Catalano F.^[1], Crispino R.^[1], De Cegli R.^[1], Zischka H.^[3], Di Schiavi E.^[2], Polishchuk R.^[1]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy, ^[2]Institute of Biosciences and BioResources, IBBR, CNR ~ Naples ~ Italy, ^[3]Institute of Molecular Toxicology and Pharmacology, Helmholtz Center ~ Munich ~ Germany

Copper operates as an essential cofactor of several enzymes driving vitally important processes in human body. However, the excess of this metal is toxic. Therefore, copper import, distribution and storage require orchestrated action of several ion transport, membrane trafficking and quality control mechanisms. Such mechanisms are seriously compromised in Wilson disease (1-3). Wilson Disease (WD) is caused by mutation in the gene encoding the hepatic copper transporter ATP7B. In response to elevated copper ATP7B traffics from the Golgi to lysosomes and biliary surface of hepatocytes, where promotes sequestration and further efflux of the excess metal (4). Loss of ATP7B function leads to toxic accumulation of copper (Cu) in the liver and in the brain with the development of severe hepatic, neurological and psychiatric symptoms. Current therapeutic strategies for WD are restricted to reducing copper absorption or Cu chelation. However, although effective, those treatments present serious side effects or limited efficiency in a large cohort of patients. Therefore, there is an urgent need to find alternative therapeutic options.

For this purpose, we used bioinformatics and high throughput screenings to identify FDA (Food and Drug Administration) approved drugs able to counteract Cu toxicity in cell model of WD. Through a number of validation assays, five drugs were selected as potential therapeutic agents promoting WD cell viability and reducing apoptosis upon Cu exposure. To prove their effectiveness, all five drugs were tested in Atp7b knockout (Atp7b^{-/-}) mice, a bona fide animal model of WD using either IP injections (4 drugs) or drug-containing diet (1 drug). Upon daily IP injections for 4 weeks, only one compound (encoded FDA#7) exhibited a clear capacity to alleviate WD manifestations in Atp7b^{-/-} mice. Indeed, FDA#7-treated mice showed significant decrease in serum liver damage markers and a substantial reduction in liver inflammation and fibrosis compared to control mice. Another drug (encoded FDA#8) was supplied with the diet and significantly reduced liver damage

and delayed the disease onset in *Atp7b*^{-/-} mice. Further RNA-seq analysis revealed that both drugs were able to activate autophagy that serves as pro-survival mechanism to help ATP7B-deficient hepatic cells to counteract Cu toxicity.

Considering the safety-profile and tolerability of AD, these drugs emerge as attractive candidates which might be used for rapid development of new therapeutic strategies for WD.

Meccanismi molecolari che coordinano il traffico di membrana e il trasporto di ioni nella malattia di Wilson

Il rame funziona come un cofattore essenziale di diversi enzimi che guidano processi vitali importanza nel corpo umano. Tuttavia, l'eccesso di questo metallo è tossico. Pertanto, l'importazione, la distribuzione e lo stoccaggio del rame richiedono un'azione orchestrata di diversi meccanismi di trasporto ionico, traffico di membrane e controllo della qualità. Tali meccanismi sono seriamente compromessi nella malattia di Wilson (1-3). La malattia di Wilson (MDV) è causata da mutazioni nel gene che codifica per il trasportatore epatico del rame ATP7B. In risposta all'elevato rame ATP7B traffica dal Golgi ai lisosomi e alla superficie biliare degli epatociti, dove promuove il sequestro e l'ulteriore efflusso del metallo in eccesso (4). La perdita della funzione di ATP7B porta all'accumulo tossico di rame nel fegato e nel cervello con lo sviluppo di gravi sintomi epatici, neurologici e psichiatrici. Le attuali strategie terapeutiche per la MDV si limitano a ridurre l'assorbimento del rame. Tuttavia, sebbene efficaci, tali trattamenti presentano gravi effetti collaterali o un'efficienza limitata in una grande coorte di pazienti. Pertanto, esiste bisogno di trovare opzioni terapeutiche alternative.

A questo scopo, abbiamo utilizzato la bioinformatica e lo high content screening per identificare farmaci approvati dalla FDA (Food and Drug Administration) in grado di contrastare la tossicità del Cu nel modello cellulare di MDW. Attraverso una serie di test di convalida, cinque farmaci sono stati selezionati come potenziali agenti terapeutici che promuovono la vitalità delle cellule MDV e riducono l'apoptosi dopo l'esposizione a rame. Per dimostrare la loro efficacia, tutti e cinque i farmaci sono stati testati in topi knockout *Atp7b* (*Atp7b*^{-/-}), un modello animale di MDW utilizzando iniezioni IP (4 composti) o dieta contenente farmaci (1 composto). Dopo iniezioni IP giornaliere per 4 settimane, solo un composto (codificato FDA # 7) ha mostrato una chiara capacità di alleviare le manifestazioni di MDW nei topi *Atp7b*^{-/-}. Infatti, i topi trattati con FDA # 7 hanno mostrato una significativa diminuzione dei marcatori di danno epatico e una sostanziale riduzione dell'infiammazione epatica e della fibrosi rispetto ai topi non trattati. Un altro farmaco (codificato FDA # 8) è stato fornito con la dieta e ha ridotto significativamente il danno epatico e ritardato l'insorgenza della malattia nei topi *Atp7b*^{-/-}. Ulteriori analisi con RNA-seq hanno rivelato che entrambi i farmaci sono stati in grado di attivare l'autofagia che funge da meccanismo pro-sopravvivenza per aiutare le cellule epatiche carenti di ATP7B a contrastare la tossicità del rame.

Considerando il profilo di biosafety e la tollerabilità, questi farmaci emergono come candidati interessanti che potrebbero essere utilizzati per un rapido sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la MDW.

Disease Name:

Wilson disease

Nome malattia:

Malattia di Wilson

Project number:

TGM22CBDM05

160. NUCLEASE-FREE TARGETED INTEGRATION OF A PROMOTERLESS MINI-ATP7B CONFERS PROLIFERATIVE ADVANTAGE TO EDITED HEPATOCYTES AND CORRECTS WILSON DISEASE

Padula A.^[1], Spinelli M.^[2], Nusco E.^[1], Capolongo F.^[1], Campione S.^[3], Perna C.^[1], Bastille A.^[4], Ericson M.^[4], Wang C.^[4], Zhang S.^[4], Amoresano A.^[2], Nacht M.^[4], Piccolo P.*^[1]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy, ^[2]Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II ~ Napoli ~ Italy, ^[3]Patology Unit, A. Cardarelli Hospital ~ Napoli ~ Italy, ^[4]LogicBio Therapeutics ~ Lexington, MA ~ United States of America

Wilson Disease (WD) is a life-threatening autosomal disorder of copper homeostasis caused by mutations in copper transporter ATP7B and characterized by toxic copper accumulation, resulting in severe and progressive liver and brain diseases. WD represents an attractive target for liver-directed gene therapy. However, classic gene replacement strategies hold limitations associated to adeno-associated viral vector (AAV) cargo capacity constraints, decline of therapeutic effect due to transgene dilution and genotoxic risk, particularly in children. We applied a liver-directed nuclease-free genome editing approach, based on AAV-mediated targeted integration of a promoterless ATP7B cDNA into the albumin locus. To this aim, we generated an AAV8 vector bearing a codon-optimized human mini-ATP7B cDNA flanked by two mouse Alb homology arms and preceded by a sequence encoding for a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 (AAV-Alb-mini-ATP7B). Intra-venous injection of AAV-Alb-mini-ATP7B in *Atp7b*^{-/-} pup and adult mice resulted in a complete rescue of survival. At sacrifice, these mice showed extensive liver repopulation by genome edited hepatocytes, associated to an amelioration of liver injury and rescue of serum ceruloplasmin oxidase activity, compared to *Atp7b*^{-/-} mice injected with a control vector. Furthermore, we combined promoterless nuclease-free genome editing with the administration of D-penicillamine, a copper chelator currently used for the therapy of WD. *Atp7b*^{-/-} mice treated with D-penicillamine and AAV-Alb-mini-ATP7B showed a significant improvement of liver pathology and reduction of copper storage compared to *Atp7b*^{-/-} mice administered with chelation therapy alone. In summary these results indicate that promoterless nuclease-free genome editing provide a significant and sustained therapeutic benefit in WD and may represent a safer alternative to classic gene replacement strategies.

La malattia di Wilson è una malattia genetica del metabolismo del rame, causata da mutazioni del gene ATP7B e caratterizzata da un accumulo tossico di rame, principalmente a carico del fegato e del cervello. Le terapie attualmente disponibili non sono efficaci in tutti i pazienti e presentano effetti collaterali anche gravi, rendendo necessario lo sviluppo di terapie alternative. La malattia di Wilson rappresenta un candidato attraente per la terapia genica diretta al fegato e studi clinici sono tuttora in corso per dimostrarne l'efficacia nei pazienti. La terapia genica classica però presenta diversi limiti in termini di sicurezza e di efficacia a lungo termine, soprattutto per i pazienti in età pediatrica, che ad oggi ne complicano l'utilizzo per la terapia della malattia di Wilson. Nel corso di questo studio abbiamo sviluppato un approccio di editing genomico per la malattia di Wilson, consistente nell'inserimento di una copia del gene ATP7B nel genoma delle cellule del fegato di topi modello della malattia, mediante l'utilizzo di vettori adeno-associati. L'inserimento della copia del gene terapeutico in una specifica regione del genoma garantisce la produzione di alti livelli di ATP7B ristretti alle cellule del fegato, evitando così eventuali effetti tossici legati all'espressione del gene in cellule diverse da quelle bersaglio e all'inserimento casuale del gene nel genoma delle cellule. I topi trattati con l'editing genomico mostravano un completo ripristino della funzione di ATP7B, associato ad significativo miglioramento della malattia epatica e del metabolismo del rame. Inoltre, la terapia si mostrava parimenti efficace quando somministrata in topi che assumevano D-penicillamina, una molecola largamente utilizzata per la terapia della malattia di Wilson, capace di legare il rame e di favorirne l'escrezione urinaria. In conclusione, i risultati derivati da questi studi potrebbero aprire la strada allo sviluppo di una nuova terapia per la malattia di Wilson, che superi le limitazioni delle precedenti terapie.

Disease Name:

Wilson disease

Nome malattia:

Malattia di Wilson

Project number:

TGM22MT03

161. MODELING WOLMAN DISEASE USING GENETICALLY ENGINEERED HUMAN LIVER ORGANIDS

Anfuso B.^[2], Selvestrel D.^[2], Altieri A.^[2], Mattivi A.^[3], Fava L.^[3], Sorrentino G.*^[1], Conti L.^[3]

^[1]Department of Medical, Surgical and Health Sciences – University of Trieste ~ Trieste ~ Italy, ^[2]Department of Life Science, University of Trieste ~ Trieste ~ Italy, ^[3]Department of Cellular, Computational and Integrative Biology, University of Trento ~ Trento ~ Italy

Wolman disease (WD) is a rare inherited autosomal recessive disease caused by mutations in the lysosomal acid lipase (LAL) gene and characterized by the accumulation of cholesteryl esters and triglycerides in lysosomes, leading to severe liver and visceral dysfunction. There is currently no cure for this devastating disease, and treatments are limited to supportive care. In this project, we aim to develop an in vitro model of WD using liver organoids derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). To this aim, we implemented a reproducible method to derive multi-cellular human liver 3D organoids composed of hepatocyte-, stellate-, biliary- and Kupffer-like cells that exhibit gene expression and functions similar to in vivo-derived tissues. Upon free fatty acid treatment, these organoids recapitulate key features of WD, including steatosis, inflammation, and fibrosis, in a multi-step manner. To design a patient-specific organotypic model of WD, we used CRISPR-Cas9 gene editing to introduce mutations in the LAL gene in iPSCs, and we are currently characterizing the hepatic organoids derived from these cells to assess their capability to model disease-associated phenotypes. This innovative platform has the potential to recapitulate pathophysiological features of WD, in vitro, including personalised response to therapy, and will offer a new approach for studying the molecular mechanisms underlying development and progression of this disease, thus facilitating the discovery of effective treatments.

Generazione di un modello sperimentale della malattia di Wolman basato su colture organotipiche epatiche umane.

La malattia di Wolman (WD) è una grave malattia rara causata da mutazioni nel gene della lipasi acida lisosomiale (LAL), il cui prodotto proteico è responsabile della degradazione di diversi lipidi cellulari. Pazienti affetti da WD hanno un'aspettativa di vita media inferiore a 4 mesi e i decessi associati a questa malattia sono determinati principalmente dal collasso metabolico delle cellule del fegato e dalla conseguente insufficienza epatica causata dall'accumulo di lipidi tossici intracellulari. Sfortunatamente, al momento non esistono cure per questa malattia e ciò è dovuto principalmente alla mancanza di modelli sperimentali in grado di rispecchiare fedelmente diversi aspetti patologici della progressione della WD. Questo progetto si propone quindi di generare un modello sperimentale di WD utilizzando i "mini-fegati" umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs). A questo scopo, nel nostro laboratorio abbiamo ottimizzato un innovativo sistema di coltura cellulare tridimensionale in grado di ricapitolare, in vitro, molti aspetti istologici e funzionali del fegato umano. Il trattamento forzato con acidi grassi liberi ha inoltre dimostrato che questi sistemi di coltura sono in grado di ricapitolare le aberrazioni metaboliche tipiche della WD. Così, abbiamo recentemente utilizzato le tecniche dell'editing genetico, basate

sulla tecnologia CRISP/Cas9, per introdurre mutazioni paziente-specifiche nel gene LIPA nelle iPSCs. Stiamo quindi caratterizzando gli organoidi derivati da queste cellule per dimostrare che questo sistema di coltura è in grado di ricapitolare diversi aspetti fisiopatologici della WD. Questa tecnologia innovativa ha il potenziale di mimare fedelmente la WD in vitro, inclusa la risposta personalizzata alla terapia, e offrirà un nuovo approccio per studiare i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e della progressione di questa malattia, facilitando così la scoperta di trattamenti efficaci.

Disease Name:

Wolman disease

Nome malattia:

Malattia di Wolman

Project number:

GGP20031

Genetic immune disease

162. CHARACTERIZATION OF HYPER-IGE CD4+ T LYMPHOCYTES AND THEIR RESPONSES TO OPPORTUNISTIC PATHOGENS.

Giorgia M.^[1], Vasco C.^[1], Clemente F.^[1], Maioli S.^[2], Carelli E.^[1], Sarnicola M.L.^[1], Crosti M.^[1], Baselli L.^[3], Dellepiane R.^[3], Carrabba M.^[3], Abrignani S.^[2], Geginat J.^[2]

^[1]Fondazione Istituto Nazionale di Genetica Molecolare (INGM) "Romeo ed Enrica Invernizzi" ~ Milan ~ Italy,

^[2]Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità ~ Milan ~ Italy, ^[3]Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milano ~ Italy

Autosomal dominant Hyper-IgE syndrome (HIES) is caused by dominant negative mutations of STAT3, a transcription factor that is critical for T-cell differentiation and consequently for the correct functioning of the immune system. HIES patients present with uncontrolled, recurrent infections with opportunistic pathogens (*S.aureus* and *C. albicans*) and high levels of IgE antibodies, leading to eczema. While the reasons for the aberrant IgE production are incompletely understood, opportunistic pathogens persist because T-cells of HIES patients are unable to produce key pro-inflammatory cytokines, namely Interleukin (IL)-17.

STAT3-deficient CD4+ cells had indeed impaired IL-17A production as expected, but produced B-helper cytokines like IL-10 and IL-21 normally. Furthermore, STAT3-deficient CD4+ cells expressed reduced but detectable Th17 associated surface markers such CCR6 and CD161. Surprisingly, CD4+ T cells could acquire IL-17A production in vitro, although with a lower efficiency than STAT3-sufficient cells. Thus, HIES patients have a severe, but not complete defect in Th17-cell differentiation. Unbiased analysis, based on the use of FlowSOM clustering and dimensionality reduction technique UMAP, indicated that there was an increased number of naïve CD4+ T cells in HIES patients compared to healthy donors, suggesting a defect in the differentiation of CD4+ lymphocytes.

To better understand the defects of STAT3-deficient cells, we evaluated their ability to respond to antigens belonging to opportunistic pathogens, such as *S. Aureus*, *S. Pneumonia* and *C. Albicans*, that cause recurrent infections in HIES patients. Compared to healthy donors, STAT3-deficient CD4+ cells show an increased production of both pro- (IFN- γ and IL-2) and anti- (IL-10) inflammatory cytokines in response to heat killed *S. Aureus* and *S. Pneumoniae*. These data suggest that STAT3-deficient CD4+ cells are not unresponsive to opportunistic pathogens but, at the same time, underline the presence of an altered cytokine production compared to healthy donors.

Our results represent an opportunity to understand the role of STAT3 in human immune responses and they could pave the way for novel therapies to control opportunistic infections (adoptive transfer of autologous, in vitro generated, pathogen-specific Th17-cells) in HIES patients.

Regolazione delle risposte mediate dai linfociti T nei pazienti con sindrome di Hyper-IgE (HIES)

La sindrome da iper-IgE (HIES) è una malattia genetica rara causata da un difetto del "Trasdatore 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 infatti presentano una risposta inefficiente contro agenti patogeni opportunistici (come *Candida Albicans* e *Staphylococcus aureus*) e soffrono di conseguenza di infezioni ricorrenti. Questo difetto immunologico è causato da una classe di cellule appartenenti al Sistema immunitario (linfociti CD4+) che sono responsabili di una produzione insufficiente di due mediatori solubili, chiamati Interleuchina (IL) -17 e IL-22, che negli individui sani regolano la risposta ad agenti patogeni. Inoltre, come indicato anche dal nome della malattia, i pazienti HIES hanno una produzione di anticorpi di classe E (IgE) esagerata, che

inducono reazioni come l'eczema. Anche questo secondo difetto immunologico è 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.

Visto il coinvolgimento dei linfociti CD4+ nella sindrome da iper-IgE, in questo progetto abbiamo caratterizzato da un punto di vista fenotipico e funzionale i linfociti T CD4+ ottenuti dal sangue di pazienti HIES e li abbiamo confrontati con quelli ottenuti da donatori sani. Abbiamo verificato come nei nostri pazienti ci sia una riduzione dei linfociti capaci di produrre IL-17 e IL-22, ma non la loro totale assenza. Abbiamo successivamente cercato di capire se queste cellule fossero in grado di rispondere agli agenti patogeni che causano infezioni ricorrenti nei pazienti HIES. I nostri dati indicano che i linfociti T CD4+ dei pazienti sono comunque in grado di rispondere a *C. Albicans* e *S. Aureus*, anche se i mediatori solubili prodotti da queste cellule sono diversi da quelli originati invece dai donatori sani, indicando come nei pazienti con sindrome da iper-IgE non vi sia una mancata risposta ai patogeni, ma piuttosto una risposta alterata.

I dati da noi ottenuti, aprono le porte per poter provare ad espandere ed "educare" i linfociti T CD4 + da pazienti HIES, 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 dei linfociti T CD4+.

Disease Name:

Hyper-IgE Syndrome

Nome malattia:

Sindrome da iper-IgE

Project number:

GGP19323

163. GENOME INTEGRITY ASSESSMENT OF EDITED CD4+ LYMPHOCYTES FOR THE TREATMENT OF HYPER-IGM 1

Canarutto D.^[1], Vavassori V.^[1], Ferrari S.^[1], Plati T.^[1], Porcellini S.^[1], Asperti C.^[1], Rovelli E.^[1], Radrizzani M.^[1], Paulis M.^[2], Villa A.^[1], Naldini L.^[1]

^[1]SR-TIGET ~ Milan ~ Italy, ^[2]IRCCS Humanitas Research Hospital ~ Rozzano ~ Italy

Hyper-IgM1 is a rare X-linked combined immunodeficiency caused by mutations in the CD40 ligand (CD40LG) gene, leading to increased susceptibility to infections, liver disease, and cancer. Median survival is 25 years (1). Haematopoietic stem cell transplantation may be curative, but can be high risk (2). Gene addition is not an option, as faithful recapitulation of gene regulation is required to avoid abnormal lymphoid proliferation (3,4). Having shown therapeutic benefit of correcting T-cells (5), we have been developing a CD4+ T-cell gene editing therapeutic strategy with Cas9 and a donor template.

Comprehensive genome integrity assessment is a fundamental question of gene editing for which there is currently no gold standard. Having previously addressed off-target activity (5), here we characterized genomic modifications of CD4+ T-cells upon gene editing at the target double strand break (DSB), as well as genome-wide. Using custom droplet digital PCR copy number variation assays we found on-target large deletions early after editing with Cas9 and an adenoviral associated virus 6 (AAV6) donor, that progressively disappeared in culture.

For the unbiased assessment of genomic events we initially performed 100-metaphase

karyotyping, which was normal. We then assessed the sensitivity of optical mapping, a high resolution restriction map technology, in detecting custom small and large rearrangements. When we applied the technology to edited CD4 T-cells edited with Cas9 and an integrase defective lentiviral donor template (IDLV), we revealed the presence of large the on-target integrations compatible with the presence of trapping events, and template concatemers in up to 21% of cells after enrichment. We did not detect other events shared among the biological replicates, nor others apparently related with previously investigated off-targets (5). Large integrations did not appear to affect the behavior of corrected cells, which expressed functional CD40L with a normal kinetic.

In summary, edited CD4+ T-cells have a reassuring genome integrity profile upon gene editing with Cas9 and IDLV. Large on-target deletions and integrations should be expected and investigated in gene editing settings with a donor template.

La sindrome da Iper IgM 1 è una rara immunodeficienza combinata dovuta a mutazioni del gene CD40LG. Essa è caratterizzata da un aumentato rischio infettivo, neoplastico, e di malattia epatica. La sopravvivenza mediana è di 25 anni (1). Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche può essere curativo, ma può essere ad alto rischio (2). La malattia non può essere trattata con approcci convenzionali di terapia genica con vettori integranti in quanto l'espressione non regolata del transgene comporta un rischio linfoproliferativo (3,4). Avendo dimostrato in precedenza il potenziale beneficio terapeutico di correggere i linfociti T (5), abbiamo continuato a sviluppare una strategia di modifica genetica dei linfociti T CD4+ con Cas9 e una cassetta correttiva.

La questione dell'integrità genomica è centrale per lo sviluppo e l'impiego dei prodotti di "gene editing", e non vi è attualmente uno standard di riferimento. Avendo già in precedenza valutato l'attività "off-target" della Cas9, abbiamo valutato gli eventi "on-target" e a livello genomico globale dei linfociti CD4+ modificati. Utilizzando una tecnologia di PCR quantitativa (ddPCR) abbiamo individuato la presenza di delezioni genomiche nelle cellule modificate, che scomparivano progressivamente in coltura.

Per valutare eventi inattesi a livello genomico abbiamo dapprima valutato il cariotipo delle cellule modificate, che è risultato normale. In seguito abbiamo valutato la sensibilità di una nuova tecnologia chiamata "optical mapping" nell'individuare riarrangiamenti genomici di diversa dimensione. Applicando questa tecnologia alle cellule corrette con Cas9 e una cassetta correttiva di vettore lentivirale con integrasi difettiva (IDLV) abbiamo individuato la presenza di integrazioni "on-target" in fino al 21% delle cellule dopo arricchimento. Non abbiamo individuato altri eventi ricorrenti tra i vari replicati biologici o eventi correlabili all'attività "off-target" della nucleasi. Dette integrazioni "on-target" non apparivano inficiare il comportamento delle cellule modificate, in quanto esse esprimevano il CD40LG con cinetica normale ed esso era funzionale.

In conclusione, i linfociti CD4+ geneticamente modificati con Cas9 e IDLV per il trattamento della sindrome da Iper IgM1 hanno un profilo genomico rassicurante. Delezioni e integrazioni anche estese sono possibili in questi contesti e devono essere tenute in considerazione.

Disease Name:

Hyper-IgM 1 Syndrome

Nome malattia:

Sindrome da iper-IgM 1

Project number:

TGT22C16

164. NUCLEAR STABILITY AND INNATE ACTIVATION IN WASP KO MYELOID CELLS**Amadio R.**^[1], Piperno G.M.^[1], Alraies Z.^[2], Lennon--Dumenil A.^[2], Benvenuti F.^[1]^[1]ICGEB ~ Trieste ~ Italy, ^[2]Institut Curie ~ Paris ~ France

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a rare immune deficiency caused by mutations in Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp). WASp induces branched actin polymerization via the Arp2/3 complex in hematopoietic cells. Multiple immune processes rely on WASp functions, ranging from phagocytosis in innate cells to B and T cell activation, which together explain defective responses to pathogens in WAS. Nowadays, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) represents the only option to correct immune defects. Still, patients show frequent autoimmune phenomena that persist or rush back even after HSCT. A major gap precluding development of tailored therapeutic intervention is our lack of knowledge on precise mechanisms underlying WAS autoimmunity.

Mounting data suggest that chronic induction of type-I interferon by WASp null myeloid cells (WKO) is key in WAS autoimmunity and our team uncovered self-DNA sensing by the cGAS-STING pathway as critical to start this inflammatory cascade. Our major goal now is to identify the origin of self-DNA and mechanisms that allow its cytosolic release and cGAS-STING activation in WAS. Based on emerging links between actin and nuclear stability, our main hypothesis is that WASp in myeloid cells may protect nuclear integrity and limit DNA leakage upon mechanical stress. To test this, we are adopting tools such as microchannels and confiners to expose myeloid cells to graded levels of mechanical insults and identify transcriptional changes induced by compression in control and WKO. In parallel, we plan to leverage reporter cell lines to track nuclear rupture, cGAS activation and IFN-I induction at the single cell level. Initial data show an altered nuclear morphology in WKO cells on 2D surfaces, with increased invagination and loss of lamin A/C intensity as compared to control. Also, we noted that mechanical compression induces higher nuclear deformation in WKO, supporting our idea that WASp controls nuclear responses to mechanical insult.

Stabilità del nucleo cellulare e attivazione immunitaria in cellule mutanti per la proteina WASp

La sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS) è una rara immunodeficienza primaria che presenta anche caratteristiche autoimmuni ed è causata da mutazioni nella proteina della sindrome di Wiskott-Aldrich (WASp). La proteina WASp promuove la polimerizzazione del citoscheletro di actina tramite il complesso Arp2/3 nelle cellule ematopoietiche. Le cellule immunitarie dipendono dalla funzione di questa proteina per portare a termine processi specifici quali la fagocitosi o l'attivazione immunitaria. Mutazioni in WASp e difetti nella polimerizzazione dell'actina spiegano quindi lo sviluppo di immunodeficienza in WAS. Gli aspetti autoimmunitari di questa patologia sono invece meno compresi, ma estremamente importanti in ottica terapeutica. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) rappresenta ad oggi l'unica opzione per correggere i difetti immunitari in WAS, ma non sempre è in grado di risolvere la componente autoimmune e diversi pazienti presentano queste complicanze anche dopo HSCT. Ciò che preclude lo sviluppo di terapie mirate per risolvere l'autoimmunità in WAS è la nostra mancanza di conoscenza sui meccanismi precisi alla base di tale fenomeno.

Dati dal nostro laboratorio suggeriscono che una produzione anomala di interferone di tipo 1 da parte delle cellule mieloidi (es. macrofagi) in assenza di WASp (WKO) è critica per scatenare l'autoimmunità. Il nostro gruppo ha scoperto che il riconoscimento di molecole di DNA circolante da parte della via cGAS-STING è fondamentale per avviare questa cascata infiammatoria in WAS. Il nostro obiettivo principale è ora quello di identificare l'origine del DNA circolante e dei meccanismi che permettono il suo rilascio nel citoplasma e l'attivazione di cGAS-STING in WAS. Sulla base di recenti studi riguardo le funzioni di WASp dell'actina sulla stabilità nucleare, la nostra ipotesi principale è che WASp nei macrofagi possa proteggere l'integrità nucleare e limitare la fuoriuscita di DNA in caso di stress meccanico. Per testare questo, stiamo adottando strumenti come

microcanali e altri dispositivi di microfabbricazione per esporre i nostri macrofagi a vari livelli di insulti meccanici e identificare i cambiamenti trascrizionali indotti dalla compressione. In parallelo, abbiamo intenzione di sfruttare linee cellulari contenenti dei geni reporter fluorescenti per monitorare la rottura nucleare, l'attivazione di cGAS e l'induzione di interferone. I dati iniziali indicano che la morfologia del nucleo in WKO è alterata, presenta una maggiore invaginazione della membrana nucleare e minor espressione della proteina Lamina A. Inoltre, abbiamo notato che la compressione meccanica induce una maggiore deformazione nucleare in WKO, osservazione che supporta la nostra idea che WASp controlli la stabilità nucleare in risposta agli insulti meccanici.

Disease Name:

Wikott-Aldrich Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Wiskott-Aldrich

Project number:

GGP20102

165. A NOVEL THERAPEUTIC STRATEGY FOR RARE GENETIC DISEASES CAUSED BY TELOMERE DYSFUNCTION

Oppezzo A.^[1], Sepe S.^[1], Rossiello F.^[1], Marinelli E.^[1], Boggio S.^[1], Di Lillo A.^[1], Rosso I.^[1], Tavella S.^[1], Matti V.^[1], Cicio G.^[1], Cancila V.^[2], Mancheno--Ferris A.^[1], Iannelli F.^[1], Tripodo C.^[2], D'Adda Di Fagagna F.^[1]

^[1]IFOM ETS – The AIRC Institute of Molecular Oncology ~ Milan ~ Italy, ^[2]Tumor Immunology Unit, Department of Health Sciences, University of Palermo ~ Palermo ~ Italy

Mutations in genes encoding proteins involved in telomere biology are associated with several debilitating human genetic disorders, usually characterized by critically short or dysfunctional telomeres that affect the homeostasis of multiple organs.

Our group has previously reported that dysfunctional telomeres are actively transcribed to generate telomeric non-coding RNAs (tncRNAs) which are essential to recruit DDR factors at damaged telomeres, thus fueling DDR and causing cellular senescence initiation and maintenance. Sequence-specific telomeric antisense oligonucleotides (tASOs) target these tncRNAs and effectively inhibit DDR activation in cultured cells (Rossiello, Nat Commun, 2017). In particular, DDR inhibition through tASOs treatment significantly improved the progeroid pathological phenotypes of a mouse model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS), an accelerated aging syndrome characterized by telomere dysfunction, genomic instability and premature entry into cellular senescence (Aguado, Nat Commun, 2019), thus validating tASOs as a promising therapeutic agent for HGPS and potentially other diseases caused by telomeric dysfunction.

Among the so-called Telomere Biology Disorders (TBD) (Rossiello, Nat Cell Biol, 2022) is the multisystemic syndrome Dyskeratosis Congenita (DC), characterized by a wide range of clinical symptoms including bone marrow failure (BMF) and pulmonary fibrosis. Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation, with all the associated complications, is currently the only treatment for BMF in DC and new approaches that target and correct the broad consequences of this disease are needed.

The telomerase-deficient (Terc^{-/-}) mouse model, characterized by telomere shortening and dysfunction, recapitulates features of DC, including reduced life span, premature aging, immune dysfunction, pulmonary fibrosis and an increased cancer incidence. Our unpublished results demonstrate that tASOs treatment restores function in vivo in mouse models of telomere dysfunction: it effectively slows progression and reverts pulmonary fibrosis in the Terc^{-/-} model and

improves survival in an aplastic anemia mouse model. We are now exploring the impact of tASOs treatments on the defective hematopoiesis of *Terc*^{-/-} mice, with the final aim of ameliorating the hematopoietic and extra-hematopoietic manifestations of DC with a single therapy.

Una nuova strategia terapeutica per malattie genetiche rare causate da disfunzione telomerica
Diverse gravi malattie genetiche sono causate da mutazioni in geni che codificano proteine coinvolte nel mantenimento dei telomeri, sezioni di DNA a sequenza ripetuta che proteggono le porzioni finali dei cromosomi. Quando i telomeri diventano troppo corti o disfunzionali iniziano un processo noto come risposta al danno al DNA (DDR) come tentativo di riparazione. Il DDR ai telomeri diventa persistente in quanto il danno telomerico è irreparabile, diventando un segnale cronico di pericolo deleterio per la cellula, che contribuisce alle manifestazioni della malattia. Nel nostro laboratorio, abbiamo ideato specifici composti noti come oligonucleotidi antisenso telomerici (tASO), che inibiscono specificamente l'attivazione del DDR telomerico.

In particolare, in un modello murino di sindrome di Hutchinson-Gilford (HGPS), una patologia da invecchiamento accelerato caratterizzata da disfunzione telomerica, instabilità genomica e senescenza cellulare prematura, l'inibizione del DDR tramite trattamento con tASOs ha migliorato il fenotipo patologico di tali animali, validando i tASOs come promettenti agenti terapeutici nel trattamento dell'HGPS e potenzialmente di altre malattie causate da disfunzione telomerica.

Tra queste vi è anche la Discheratosi Congenita (DC), una malattia genetica rara caratterizzata da diversi sintomi, tra cui insufficienza midollare (diminuita produzione delle cellule del sangue) e fibrosi polmonare. L'unico trattamento è rappresentato dal trapianto di cellule staminali ematopoietiche, con i rischi associati di infezioni e rigetto, senza alcun impatto sulla fibrosi polmonare. Risulta quindi necessario un trattamento che abbia un effetto su tutti i sintomi della malattia.

I nostri risultati dimostrano che i tASO curano la fibrosi polmonare in un modello murino di DC (conosciuto come *Terc*^{-/-}) e aumentano la durata della vita di un altro modello murino caratterizzato da disfunzione telomerica e grave insufficienza midollare. Di conseguenza, stiamo studiando l'effetto dei tASO nel modello *Terc*^{-/-}, per stabilire se possono curare anche le anomalie del sistema ematopoietico di questo modello, più simili a quelle dei pazienti DC. L'obiettivo finale è di trattare le diverse manifestazioni cliniche della DC con un'unica terapia.

Disease Name:

Dyskeratosis Congenita

Nome malattia:

Discheratosi Congenita

Project number:

GGP17111

166. CELLULAR SENESCENCE AND INFLAMMATORY PROGRAMS ARE UNINTENDED CONSEQUENCES OF CRISPR-CAS9 GENE EDITING IN HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITORS CELLS

Conti A.*^[1], De Marco R.^[1], Tavella T.^[1], Midena F.^[1], Ferrari S.^[1], Beretta S.^[1], Brombin C.^[3], Merelli I.^[2], Naldini L.^[1], Di Micco R.^[1]

^[1]SR-TIGET ~ Milan ~ Italy, ^[2]National research Council, Institute for Biomedical technologies ~ Segrate Milano ~ Italy,

^[3]University Center for Statistics in the Biomedical Sciences ~ Milano ~ Italy

Gene editing (GE) in hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) is a revolutionary site-specific gene correction strategy for a plethora of immune-hematological diseases. Despite the rapid development of advanced GE-based therapies, a few challenges remain to be faced to improve GE efficiency and the reduced repopulating potential upon transplantation. We previously showed that the combination of nuclease-induced Double Strand Break with DNA repair template for Homology Directed Repair (HDR) delivered by AAV6 caused cumulative activation of the p53-mediated DNA Damage Response (DDR) pathway constraining HSPC proliferation and yield, suggesting that DDR-related cellular programs may inadvertently contribute to HSPC dysfunctions upon gene editing. Protracted DDR signaling has been causatively linked to the establishment of cellular senescence, a condition in which cells, despite being still alive, are unable to further proliferate. By integrating transcriptional analysis (up to the single cell level) with innovative imaging-based cellular assays we reported induction of cellular senescence markers (p16 and Senescence-Associated β -Galactosidase) and pro-inflammatory programs across HSPC subtypes and in vivo in the human graft, specifically in cells that have undergone HDR. Consistently, we found open chromatin at promoters of several senescence-gene categories and inflammatory genes of the IL1 axis (an upstream mediator of DDR-dependent inflammation) and NF- κ B pathway (a key regulator of inflammatory genes upon several stressors). Moreover, transcriptional activation of inflammatory cytokines in edited HSPC was dependent on the apical DDR kinase ATM and partly mitigated by transient administration of a p53 dominant negative form (GSE56). In this context, temporary inhibition of IL1 and NF- κ B pathways at the time of GE resulted in increased clonogenicity of edited HSPC in vitro and ameliorated long-term hematopoietic reconstitution in xenotransplanted mice. We also reported a decrease in senescence markers in both cord blood and mobilized peripheral blood-derived HSPC upon GE. By a barcoding-based strategy, we performed in vivo clonal tracking of HDR-edited HSPC revealing that IL1 inhibition improved polyclonal reconstitution and better preserved self-renewal and multi-potency of individual edited HSPC. Our findings define senescence and inflammatory programs as long-term consequences of CRISPR-Cas9 engineered human HSPC and pave the way for the development of novel strategies based on senescence modulation and anti-inflammatory molecules to overcome adverse cellular responses for efficient HSPC-based clinical applications.

Studiare l'impatto delle strategie di ingegneria genetica sulla biologia delle staminali del sangue. Le cellule staminali ematopoietiche hanno l'enorme potenziale di dar vita a tutte le cellule mature del sangue. Purtroppo, con l'avanzare dell'età, le cellule staminali invecchiano e non riescono più a garantire l'omeostasi tissutale. In maniera simile, le cellule staminali sottoposte allo stress del trapianto o manipolate in coltura per approcci di terapia genica possono accidentalmente attivare delle risposte cellulari che ne limitano la ricostituzione ematopoietica, con segni di invecchiamento prematuro. La nostra ricerca ha lo scopo di identificare i meccanismi molecolari che causano la ridotta funzionalità delle staminali ematopoietiche durante l'invecchiamento fisiologico e in risposta alla manipolazione genica, con il fine ultimo di sviluppare delle nuove strategie di "ringiovanimento" delle stesse per applicazioni di terapia genica e cellulare più ampie e sicure.

Disease Name:

Dyskeratosis Congenita

Nome malattia:

Discheratosi Congenita

Project number:

TGT22C05

Genetic renal disease

167. DECIPHERING DYSFUNCTIONAL METABOLIC PATHWAYS IN NEPHROPATIC CYSTINOSIS

Cillo M., Esposito A., Agostinis R., Brunetti M.E., Napolitano G.*

Tigem ~ Napoli ~ Italy

Cystinosis is a multisystemic lysosomal storage disorder (LSD) due to loss-of-function mutations in the lysosomal transporter of cystine, cystinosis (CTNS). Loss of CTNS results in lysosomal cystine overload and cell dysfunction in several tissues, particularly in the kidney and eyes, with major clinical manifestations between childhood and adolescence. The current treatment for cystinotic patients consists of lysosomal overload-decreasing therapy by the use of cysteamine, a drug that reduces intralysosomal levels of cystine. However, the use of cysteamine cannot completely prevent the clinical manifestations of the disease, such as renal injury. In addition, published evidence suggests that specific mutations in CTNS do not impact cystine transport activity while still causing cystinosis. These findings indicate that lysosomal cystine accumulation may not be the only cause of cystinosis and suggest that other key functions of CTNS may be responsible for disease pathogenesis. Our main goal is to determine whether deficiency of CTNS causes metabolic alterations that may contribute, in addition to lysosomal overload, to the phenotype observed in cystinosis. By performing unbiased phospho-proteomic and interactome analyses, we aim to determine the role of CTNS as an intracellular metabolic receptor able to signal cystine availability through the activation of metabolic signaling pathways. Our ultimate goal is to assess the consequence of CTNS dysfunction in metabolic homeostasis and to determine the impact of these findings in the pathogenesis of cystinosis.

La cistinosi appartiene ad un gruppo di malattie definite da accumulo lisosomiale (LSD) ed è dovuta a mutazioni a carico di CTNS, gene codificante per il trasportatore cistinosina. Il compito della cistinosina è quello di trasportare l'aminoacido cistina dall'interno all'esterno del lisosoma, un organello che nella cellula svolge importanti funzioni metaboliche. La perdita di CTNS provoca sovraccarico di cistina lisosomiale e disfunzione cellulare in diversi tessuti, in particolare nei reni e negli occhi. La terapia attualmente in uso per la cistinosi consiste nell'uso della cisteamina, un farmaco che riduce i livelli lisosomiali di cistina. Tuttavia, l'uso della sola cisteamina non riesce a ripristinare la completa funzionalità cellulare nei tessuti affetti. Inoltre, dati scientifici recentemente pubblicati suggeriscono che specifiche mutazioni a carico di CTNS causano cistinosi nonostante queste stesse mutazioni non influiscano sull'attività di trasporto della cistina. Ciò suggerisce che l'accumulo di cistina lisosomiale potrebbe non essere l'unica causa di cistinosi e che la perdita di altre funzioni chiave di CTNS, ancora sconosciute, potrebbe contribuire alla patogenesi della malattia. Il nostro obiettivo principale è quello di comprendere a pieno il ruolo di CTNS nel metabolismo cellulare e determinare come la sua perdita possa generare problemi metabolici, in aggiunta al sovraccarico lisosomiale, che contribuiscono al fenotipo osservato nella cistinosi. Attraverso l'utilizzo di sofisticate ed innovative tecnologie miriamo a determinare il ruolo di CTNS come possibile recettore metabolico, in grado di sentire e segnalare la disponibilità di cistina intracellulare in modo da produrre una risposta metabolica appropriata. Il nostro obiettivo finale è quello di valutare le conseguenze che la disfunzione di CTNS può avere sul metabolismo cellulare e come questo contribuisca alla patogenesi della cistinosi.

Disease Name:

Cystinosis

Nome malattia:

Cistinosi

Project number:

TGM22CBDM09

168. KIDNEY ORGANIDS UNVEILED A NOVEL ROLE OF OCRL IN LIPID METABOLISM ASSOCIATED WITH THE PROGRESSIVE DECLINE OF KIDNEY FUNCTION IN LOWE SYNDROME

Testa M., Cervellini F., Patanella L., Caserta L., Polishchuk E., De Cegli R., De Matteis M.A., Staiano L.*

Telethon Institute of Genetics and Medicine ~ Pozzuoli ~ Italy

Fatty Acids (FAs) are transported from Lipid Droplets (LDs) to peroxisomes and mitochondria where they are used as a source of energy. Kidney proximal tubule epithelial cells mostly rely on FAs metabolism for energy production and its impairment results in severe cell damage and cell death. Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PI4,5P2) favors the contacts between LDs and peroxisomes allowing FAs metabolism and transport to mitochondria. PI4,5P2 level is increased in Lowe Syndrome (LS), a rare genetic disease caused by mutations in OCRL, a PI4,5P2 5-phosphatase characterized by congenital cataracts, intellectual disabilities, and Renal Fanconi Syndrome. The decline of kidney function towards chronic kidney disease (CKD) has been observed in several LS patients, although its pathogenesis is understudied. To discover new molecular mechanisms of proximal tubule dysfunction and CKD in LS we investigated the role of OCRL and PI4,5P2 in the regulation of LDs-peroxisomes-mitochondria interplay and its effect on FAs metabolism. In kidney proximal tubule cells depleted of OCRL, PI4,5P2 accumulates on LDs and peroxisomes reducing the transport of fueling lipids to mitochondria that display lower mitochondrial membrane potential, increased ROS and structural abnormalities. Cells and kidney organoids lacking OCRL display an increased number of PI4,5P2-rich LDs because of the combined impairment of LDs contact with peroxisomes. Finally, kidney organoids lacking OCRL display increased deposition of extracellular matrix and thus increased fibrosis, which is a hallmark of CKD. In summary, this study is paving the way to a wider understanding of kidney dysfunction in LS and aims at the discovery of new fundamental cell biology mechanisms controlled by PI4,5P2 and OCRL.

Identificazione, mediante utilizzo di “mini reni” generati in laboratorio, di un nuovo ruolo di OCRL come controllore del metabolismo dei lipidi che può spiegare il declino della funzionalità renale nei pazienti con Sindrome di Lowe.

Gli acidi grassi presenti all'interno delle cellule vengono trasferiti dal loro sito di stoccaggio, le goccioline lipidiche, ai perossisomi e ai mitocondri dove vengono utilizzati come fonte di energia. Le cellule epiteliali del tubulo prossimale del rene utilizzano principalmente gli acidi grassi per la produzione di energia e, laddove questa fonte di energia non possa essere sfruttata, le cellule vanno incontro a malfunzionamenti e morte cellulare. Il fosfatidilinositolo 4,5 bisfosfato (PIP2) favorisce i contatti tra le goccioline lipidiche ed i perossisomi consentendo le prime fasi del metabolismo degli acidi grassi e il loro trasporto ai mitocondri. Il livello di PIP2 è aumentato nella Sindrome di Lowe, una rara malattia genetica causata da mutazioni del gene OCRL caratterizzata da cataratta congenita, disabilità intellettive e Sindrome renale di Fanconi. Il declino della funzione renale verso l'insufficienza renale cronica è stato osservato in diversi pazienti con Sindrome di Lowe, sebbene la sua patogenesi sia poco studiata. Per scoprire nuovi meccanismi molecolari alla base della disfunzione del tubulo prossimale e dell'insufficienza renale cronica nella Sindrome di Lowe abbiamo studiato il ruolo di OCRL e del PIP2 nella regolazione delle interazioni tra goccioline lipidiche, perossisomi e mitocondri e il loro effetto sul metabolismo degli acidi grassi. Nelle cellule del tubulo prossimale del rene in assenza di OCRL, il PIP2 si accumula sulle goccioline lipidiche e

sui perossisomi riducendo il trasporto degli acidi grassi ai mitocondri. Di conseguenza, i mitocondri sono alterati, mostrano un potenziale di membrana mitocondriale inferiore, un aumento delle molecole ossidanti e delle anomalie strutturali. Le cellule e gli organoidi renali (mini reni) privi di OCRL mostrano un numero maggiore di goccioline lipidiche ricche di PIP2 a causa della compromissione dei contatti delle stesse con i perossisomi. Infine, gli organoidi renali privi di OCRL mostrano una maggiore deposizione di matrice extracellulare e quindi una maggiore fibrosi, che è un segno distintivo dell'insufficienza renale cronica. In sintesi, questo studio sta aprendo la strada a una più ampia comprensione della disfunzione renale nella Sindrome di Lowe e mira alla scoperta di nuovi meccanismi fondamentali di biologia cellulare controllati da PIP2 e OCRL.

Disease Name:

Lowe Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Lowe

Project number:

TGM22CBDM11

169. DISSECTING THE ROLE OF TFEB IN AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

Di Malta C.*

Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli (Napoli) ~ Italy

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common monogenic life-threatening human systemic disease, with an incidence of 1:1000 and is due to loss of function mutations in PKD1 (85% of the cases) or PKD2 (15% of the cases) genes. This condition causes cyst formation in different organs, in particular the kidney. Previous studies indicate that mTORC1 pathway is found hyper-activated in cystic lesions and participates to the over-growth process underlying cystogenesis. The activity of mTORC1 complex is directly controlled by the RagGTPases (Rags), which promote mTORC1 lysosomal recruitment, and Rheb, an activator of mTOR kinase activity. Both regulators act as small GTPases, located at the lysosome. We showed that the Transcription Factor EB (TFEB), master regulator of lysosomal biogenesis and function, also controls mTORC1 lysosomal signaling by regulating the expression of the Rags, and increased activation of TFEB promotes mTORC1 hyperactivity and renal cystogenesis. Interestingly, recent data indicate increased nuclear localization and activity of TFEB in ADPKD models. However, the role of TFEB in ADPKD is completely unknown. We propose to investigate the contribution of TFEB to ADPKD pathogenesis while dissecting the molecular mechanism underlying TFEB activation in this pathology through mouse genetics and cell biology approaches. The proposed project has the potential to discover a novel pathogenic mechanism and a candidate target for the treatment of ADPKD.

La malattia da Rene Policistico Autosomico Dominante (ADPKD) rappresenta una delle malattie genetiche più comuni ed invalidanti ed ha un'incidenza di 1:1000 nati. Tale sindrome causa la formazione di cisti in diversi organi, in particolare il rene. Queste cisti aumentano in maniera drammatica la dimensione dei reni e compromettono l'integrità funzionale del restante parenchima normale. In genere, i segni più severi della patologia insorgono intorno ai 50 anni e circa la metà dei pazienti affetti da ADPKD va incontro a malattia renale allo stadio terminale (ESRD), la quale richiede trapianto renale o dialisi. La maggioranza dei casi di ADPKD è causato da mutazioni nel

gene PKD1 che codifica la proteina policistina 1. E' noto da tempo che il pathway molecolare di mTORC1 e' iper-attivato nelle lesioni cistiche e contribuisce al fenotipo iper-proliferativo che favorisce il processo cistogenico. Abbiamo precedentemente dimostrato che il signaling di mTORC1 e' controllato dal fattore di trascrizione TFEB, membro della famiglia dei fattori di trascrizione MiT/TFE e regolatore della biogenesi e dell'attivita' dei lisosomi. Dati recenti condotti in laboratorio hanno evidenziato che cellule knock-out (KO) per PKD1 presentano una aumentata attivazione di TFEB. Questo progetto e' finalizzato a comprendere la regolazione di TFEB nel contesto della malattia da Rene Policistico Autosomico Dominante e a definire il suo contributo alla patologia. Tale progetto ha il potenziale di condurre all'identificazione di un nuovo meccanismo patogenetico ed un nuovo target farmacologico per il trattamento di ADPKD.

Disease Name:

Polycystic kidney disease, autosomal dominant

Nome malattia:

Rene polistico, autosomico dominante

Project number:

TGM22CBDM08

170. ROLE OF QUALITY CONTROL IN THE EARLY SECRETORY COMPARTMENT IN AUTOSOMAL DOMINANT TUBULOINTERSTITIAL KIDNEY DISEASE

Schaeffer C.^[2], Tesoriero C.^[1], Cratere M.^[2], Ghirotto F.^[1], Vettori A.^[1], Rampoldi L.^{*[2]}

^[1]University of Verona ~ Verona ~ Italy, ^[2]University Vita-Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy

Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease (ADTKD) is a clinical entity mainly characterized by interstitial fibrosis and tubular damage leading to end-stage kidney disease. UMOD and REN, encoding for uromodulin and renin respectively, are among responsible genes. UMOD mutations and a subset of REN mutations, mapping in the mature part of the protein, lead to mutant protein accumulation in the endoplasmic reticulum (ER) and activation of the Unfolded Protein Response (UPR) [1]. In ER stress conditions, increased leakage of ER resident proteins has been reported, with potential damaging effects [2]. In line with this observation, several ER-resident proteins containing KDEL or KDEL like retention signal (i.e. Bip, Manf) are found in ADTKD mouse/patient urines [3, 4]. Such proteins are ligands of KDEL receptors (KDELRL) that normally retrieved them in the ER through recognition of their ER retention signal at the cis Golgi [5, 6].

The KDEL receptor family is composed of 3 members (KDELRL1, KDELRL2 and KDELRL3). The screening of binding affinity for the different KDELRLs highlights differences, thus suggesting non-overlapping functions [7]. Functional studies have mostly focused on KDELRL1 and showed its importance in maintaining ER homeostasis by regulating bidirectional transport from the ER to the Golgi and from the Golgi to the plasma membrane [8]. Such activity is mediated by its ability to signal via Src kinases and PKA [9, 10]. Despite the growing interest, there is still a significant gap of knowledge concerning the specific role of each KDELRL. Our preliminary data demonstrate consistent KDELRL3 overexpression in different in vitro and in vivo ADTKD models characterized by mutant protein ER retention and ER stress activation. Given its known activation downstream of UPR induction [2] and the fact that it is the only KDELRL consistently upregulated in all ADTKD models, we hypothesize that KDELRL3 plays a role in proteinopathies characterized by accumulation of mutant protein in the ER.

In this project we aim at characterizing the adaptive or maladaptive role of KDELRL3 in the pathogenesis of ER storage diseases envisaging ADTKD as a paradigm disorder. We will study 1)

the effects of its expression modulation; 2) its contribution in shaping trafficking along the secretory pathway; 3) its signaling functions. We will employ a comprehensive multidisciplinary approach, integrating different models ranging from in vitro models to zebrafish and mouse models that will be used in hypothesis-driven and multiomics-based studies.

Ruolo dei meccanismi di controllo di qualità nella via secretoria cellulare nella malattia renale tubulointerstiziale autosomica dominante.

La malattia renale tubulointerstiziale autosomica dominante (ADTKD) è un'entità clinica caratterizzata principalmente da progressivo danno e perdita della funzione renale. Diversi geni causano questa malattia, inclusi UMOD e REN, che codificano rispettivamente per uromodulina e renina. Le mutazioni in UMOD e REN portano all'accumulo intracellulare della proteina mutata all'interno del comparto cellulare chiamato reticolo endoplasmatico (RE), creando una condizione di stress cellulare. In tali condizioni, alcune proteine che risiedono all'interno dell'ER iniziano a essere secrete. In condizioni fisiologiche se tali proteine fuoriescono erroneamente dal RE vengono recuperate da recettori denominati KDELR. Esistono 3 diversi recettori, chiamati KDELR1, KDELR2 e KDELR3, il cui ruolo specifico è attualmente sconosciuto. Nei modelli ADTKD UMOD e REN che utilizziamo in laboratorio, comprendenti cellule e un modello murino, abbiamo osservato un aumento specifico e significativo di KDELR3. Precedenti studi hanno riportato che l'espressione di KDELR3 aumenta sotto stress del RE, suggerendone una funzione specifica.

In questo progetto ci proponiamo di studiare il ruolo di KDELR3 nella patogenesi delle malattie da accumulo di proteina mutata nel RE, quale l'ADTKD. Studieremo l'effetto della modulazione del livello di espressione di KDELR3 per capire se ha un ruolo positivo o negativo. Inoltre, analizzeremo se in condizioni di stress del RE KDELR3 regola il trasporto intracellulare di proteine e se attiva segnali specifici.

I risultati attesi saranno importanti per capire il ruolo di KDELR3 e avranno rilevanza per ADTKD poiché otterremo nuove informazioni sui meccanismi della malattia, che potrebbero portare a nuove strategie terapeutiche. Inoltre, genereremo un modello in pesce di ADTKD che potrebbe essere utilizzato in futuri studi di screening per identificare molecole con rilevanza terapeutica. La scoperta del ruolo di KDELR3 potrebbe essere rilevante anche per altre malattie che condividono un meccanismo cellulare simile a ADTKD.

Disease Name:

Tubulointerstitial Kidney Disease, Autosomal Dominant

Nome malattia:

Malattia Renale Tubulointerstiziale autosomica dominante

Project number:

GJC21104

171. UNRAVELLING THE PATHOGENIC MECHANISM OF CEP83 MUTATIONS IN NEPHRONOPHTHISIS

Migliorati D.^[1], Mattivi A.^[1], Laporte M.^[2], Guichard P.^[2], Hamel V.^[2], Fava L.^[1]

^[1]University of Trento ~ Trento ~ Italy, ^[2]University of Geneva ~ Geneva ~ Switzerland

Distal appendages (DAs) are ninefold pinwheel-like structures protruding from the distal end of the mother centriole. They are essential for the docking of the basal body to the plasma membrane and thus represent an absolute requirement for the formation of the primary cilium. CEP83 is the

innermost component in the hierarchical organization of DA proteins and is necessary for the recruitment of all other DA components. As a consequence, CEP83 is required for ciliogenesis. Mutations in CEP83 have been linked to nephronophthisis (NPHP), a genetic disorder in which the formation and function of the primary cilium are affected and thus included in the spectrum of ciliopathies. Despite the known role of CEP83 in the initial steps of ciliogenesis, the pathogenic mechanism of CEP83 mutations still has not been clarified. Considering that ciliogenesis is essential for embryonic development, CEP83-related ciliopathies are most likely arising from a subtle perturbation of ciliary functionality, rather than from a complete abrogation of the role of this protein in the assembly of the primary cilium.

To elucidate this phenomenon, we took advantage of our expertise in the CRISPR/Cas9-mediated generation of knock-in cell lines and obtained RPE1 clones bearing CEP83 mutations associated with infantile nephronophthisis. Specifically, we generated homozygote knock-ins for two different mutations that were found in NPHP patients and that are known to affect coiled-coil domains of CEP83. Importantly, we plan to expand our panel of mutations affecting DA proteins and model cell lines as well.

In this poster, I will present a preliminary characterization of the structural alterations arising at the level of the DAs in these cellular models by exploiting expansion microscopy. Briefly, we discovered that one of the mutations causes a marked perturbation of DAs and thereby ciliary assembly, with an increasing extent in the loss of the canonical ninefold symmetry when proceeding from the inner to the outer protein components. On the contrary, a second mutation did not display measurable structural alterations, either of DAs or cilia.

Considering that DAs are involved in the gating function that governs the transport of cargoes to and from the ciliary compartment, we hypothesize that some ciliopathy DA protein mutations might not impact primary ciliogenesis, but rather alter the ciliary gating. To test this, we are presently establishing efficient ways to express a ciliary-targeted peroxidase (known as APEX2) allowing us to label the ciliary proteome with biotin, followed by mass spectrometry-based protein identification. This will enable us to define an inventory of the ciliary proteome across different isogenic samples. The combination of these approaches will clarify the role of CEP83 in the pathogenesis of NPHP, potentially informing about novel therapeutic strategies for patients suffering from this ciliopathy.

"Studio di una piccola struttura cellulare coinvolta nella patogenesi delle ciliopatie del rene"

Il ciglio primario è un organello cellulare simile ad un'antenna e coinvolto nella percezione dell'ambiente circostante. Il suo assemblaggio è garantito dalla presenza di complesse strutture proteiche dette corpi basali. La proteina CEP83 è una componente fondamentale dei corpi basali ed è necessaria alla loro abilità di formare ciglia. Le mutazioni del gene CEP83 possono causare una malattia genetica detta nefronoftisi (NPHP), caratterizzata dalla presenza di ciglia primarie che non funzionano correttamente.

Ai fini di comprendere meglio questo fenomeno, abbiamo deciso di analizzare diverse mutazioni di CEP83 trovate in pazienti con NPHP in modelli cellulari che abbiamo sviluppato usando l'ingegneria genetica. Grazie a tecniche di microscopia avanzata, abbiamo avviato degli studi volti a stabilire le alterazioni strutturali sia del corpo basale che del ciglio nelle cellule con CEP83 malfunzionante. Sorprendentemente, una delle mutazioni analizzate causa delle aberrazioni strutturali molto marcate, mentre per un'altra mutazione analizzata non si osservano difetti strutturali visibili.

Attualmente ci stiamo concentrando sullo sviluppo di metodi volti a determinare la composizione proteica del ciglio primario nei diversi modelli cellulari. Ipotizziamo infatti che mutazioni a carico di geni del corpo basale possano impattare sulla composizione proteica del ciglio, determinando dunque un malfunzionamento dell'antenna in assenza di suoi difetti strutturali evidenti.

Con la nostra ricerca ci riproponiamo pertanto di comprendere i meccanismi con cui le mutazioni dei geni del corpo basale causano NPHP e di creare modelli cellulari per studiare nuovi approcci terapeutici della patologia.

Disease Name:

Retinitis Pigmentosa; Nephronophthisis

Nome malattia:

Retinite pigmentosa; Nefronoftisi

Project number:

GJC21181

Genetic respiratory disease

172. RESCUE OF MUTANT CFTR CHLORIDE CHANNELS BY A MIMETIC PEPTIDE TARGETING THE A-KINASE ANCHORING FUNCTION OF PI3K γ

Della Sala A.*^[1], Murabito A.^[1], Mergioti M.^[1], Capurro V.^[2], Loffreda A.^[3], Conti J.^[5], Raimondi A.^[3], Sondo E.^[2], Melotti P.^[5], Sorio C.^[5], Tacchetti C.^[3], Lukacs G.^[4], Pedemonte N.^[2], Hirsch E.^[1], Ghigo A.^[1]

^[1]Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences ~ Torino ~ Italy, ^[2]Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[3]Experimental Imaging Center, San Raffaele Scientific Institute, Ospedale San Raffaele ~ Milano ~ Italy, ^[4]Department of Physiology, McGill University ~ Montréal, Quebec ~ Canada, ^[5]Department of Medicine- Section of General Pathology, University of Verona ~ Verona ~ Italy

Background: Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cAMP-activated Cl⁻ channel whose dysfunction leads to respiratory failure. The approval of CFTR modulators has opened the possibility of targeting the basic molecular defects underlying CF. Nevertheless, these molecules fail to completely rescue the activity of CFTR mutants, and patients with rare mutations are not eligible for these treatments. Hypothesis and objectives: We previously identified phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ) as a PKA-anchoring protein that tethers PKA to cAMP hydrolysing enzymes, restraining cAMP-mediated activation of CFTR. Accordingly, we conceived a cell-permeable mimetic peptide (PI3K γ MP) that, by targeting PI3K γ scaffold activity, increases sub-cortical levels of cAMP, the second messenger known to increase channel activation. Here, we aim at demonstrating PI3K γ MP as an innovative medicinal product that can be exploited to reinstate the function of rare class III-IV CFTR mutants, either directly or by potentiating the efficacy of approved CFTR modulators. Methods: We will investigate the ability of the PI3K γ MP to rescue the function of rare CFTR mutants by evaluating CFTR activity in cell lines and primary cells expressing rare class III-IV CFTR variants. Results: Previous experiments from our laboratory indicate that PI3K γ MP inhibits PI3K γ -bound phosphodiesterase 4 and drives a localized increase in cAMP responsible for PKA-mediated phosphorylation (S737) and opening of wild-type CFTR. In primary bronchial F508del cells, PI3K γ MP potentiates Cl⁻ secretion up to 5 and 2 folds when added on top of Orkambi and Kaftrio, respectively. Notably, the peptide also raises the amount of CFTR at the plasma membrane possibly via protein kinase D (PKD1), a key player in cellular trafficking and exocytosis found to be phosphorylated upon PI3K γ MP treatment. Furthermore, preliminary data revealed that PI3K γ MP is able to rescue the opening of the R334W CFTR variant, a rare Class III mutant that is currently not eligible for modulator treatment. Measurement of short-circuit currents (ISC) in intestinal organoids bearing the 2184insA and the R334W allele, shows that acute application of PI3K γ MP induces an increase in CFTR conductance when applied alone or in association with forskolin. Intriguingly, the peptide retains the ability to partially increase ISC even in the presence of a CFTR-inhibitor, suggesting the ability of the compound to trigger Cl⁻ secretion by activating channels that enhance the electrochemical driving force. Conclusions: With this project, we expect to verify that the mechanism of action of PI3K γ MP, i.e. localized cAMP/PKA elevation in the CFTR compartment, can be exploited i) to directly rescue the activity of rare class III/IV mutants responsive to cAMP stimulation; ii) potentiate the effects of Kaftrio on rare mutants for which this treatment has been approved.

Ripristino dell'attività di mutanti rari del CFTR con un peptide derivato da PI3K γ che mira alla funzione di ancoraggio della chinasi A

La Fibrosi Cistica (FC) è una patologia causata da mutazioni nel gene che codifica per il CFTR, canale al cloruro attivato dal cAMP la cui disfunzione porta a insufficienza respiratoria.

L'approvazione dei modulatori del CFTR ha aperto alla possibilità di bersagliare i difetti molecolari alla base della patologia. Tuttavia, queste molecole non riescono a ripristinare completamente

l'attività dei mutanti del CFTR, e i pazienti con mutazioni rare non sono eleggibili per questi trattamenti. Ipotesi e obiettivi: Abbiamo dimostrato in precedenza che l'enzima fosfoinositide 3-chinasi γ (PI3K γ) limita l'attivazione del canale CFTR agendo come "ancora" per PKA. Di conseguenza, abbiamo ideato un peptide permeabile alla cellula (PI3K γ MP), che bloccando questa funzione di PI3K γ , aumenta i livelli subcorticali di cAMP, il secondo messaggero noto per indurre l'attivazione del canale. L'obiettivo del progetto è quello di validare PI3K γ MP come medicinale innovativo che per ripristinare la funzione di mutanti rari del CFTR di classe III-IV, direttamente o potenziando l'efficacia dei modulatori approvati. Metodi: Indagheremo la capacità di PI3K γ MP di ripristinare l'attività di mutanti rari del CFTR valutando l'attività del canale in linee cellulari e cellule primarie che esprimono varianti rare di classe III-IV. Risultati: Esperimenti condotti nel nostro laboratorio indicano che PI3K γ MP sia in grado di inibire l'attività della fosfodiesterasi 4 portando ad un aumento localizzato di cAMP responsabile della fosforilazione mediata da PKA (S737) e dell'apertura del wt-CFTR. Nelle cellule bronchiali primarie derivate da pazienti che esprimono il F508del-CFTR, PI3K γ MP potenzia fino a 5 e 2 volte la secrezione di Cl⁻ quando usato in combinazione rispettivamente con Orkambi e Kafrio. In particolare, il peptide aumenta anche la quantità di CFTR sulla membrana plasmatica, tramite la proteina chinasi D (PKD1), un attore chiave nel traffico cellulare e esocitosi che risulta fosforilato dopo trattamento con PI3K γ MP. Inoltre, dati preliminari hanno rivelato che PI3K γ MP è in grado di ripristinare l'apertura della variante R334W-CFTR, un raro mutante di classe III che attualmente non è idoneo per il trattamento da modulatori. La misurazione delle correnti di cloruro in organoidi intestinali portatori degli alleli 2184insA e R334W, mostra come l'applicazione acuta di PI3K γ MP promuove l'attività del CFTR da solo o in associazione con forskolina. Curiosamente, PI3K γ MP conserva la capacità di aumentare le correnti di Cl⁻ in presenza di un inibitore del CFTR, suggerendo l'attività elettrochimica su altri canali. Ci aspettiamo di convalidare il meccanismo di azione di PI3K γ MP per ripristinare la funzionalità di varianti rare del CFTR; potenziare l'effetto di Kafrio su mutanti rari per i quali è stato approvato questo trattamento.

Disease Name:

Cystic fibrosis

Nome malattia:

Fibrosi Cistica

Project number:

GGP20079

173. PHARMACOLOGICAL MODULATION OF ION TRANSPORT TO TREAT THE BASIC DEFECT IN CYSTIC FIBROSIS

Venturini A., Borrelli A., Genovese M.*, Guidone D., Buccirosi M., Renda M., Galiotta L.J.V.

TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy

The airway epithelium plays a fundamental protective role in the respiratory system against microbial agents. A main defense mechanism is mucociliary clearance (MCC). MCC efficacy depends on airway surface properties, which are controlled by the activity of ion channels and transporters. In particular, the viscosity of secreted mucins depends on hydration as well as on pH/[HCO₃⁻] in the airway surface fluid. The protective role of the airway epithelium is disrupted in two genetic diseases: cystic fibrosis (CF) and primary ciliary dyskinesia (PCD). In CF, loss-of-function of the CFTR channel impairs Cl⁻ and HCO₃⁻ secretion. PCD is instead caused by loss-of-function of genes involved in cilia formation and beating. Despite the different primary defect, CF and PCD share a similar pathophysiological condition that derives from the impairment of MCC.

This condition favors the colonization of the airways by bacteria that in turn is the trigger for a chronic inflammatory state. Inflammation induces mucus hypersecretion, further worsening MCC and favoring intra-mucus bacterial survival and proliferation.

Our goal is to develop novel pharmacological strategies to improve MCC in CF and PCD. This overall goal is addressed by: i) the development of novel correctors to rescue mutant CFTR function; ii) the identification of small molecules to overcome the basic defect caused by premature termination codons (PTCs), which are found in both CF and PCD patients; iii) improvement of MCC by modulation of alternative targets.

In collaboration with Prof. Paola Barraja (University of Palermo), we are working at the optimization of a novel class of pharmacological correctors to improve the trafficking and function of CFTR with Phe508del and other CF mutations. By screening a 9,000 compounds library with a functional assay, we are looking for inhibitors of nonsense-mediated RNA decay (NMD) a phenomenon that limits the rescue of proteins affected by PTCs. These compounds may be useful for both CF and PCD. Finally, we recently found that IL-17, a cytokine with an important role in anti-bacterial response, has a particular detrimental effect on MCC properties, particularly in CF airway epithelia. We have investigated the underlying mechanisms, revealing that IL-17 upregulates the expression of ATP12A proton pump, SLC26A4 anion exchanger, and ENaC sodium channel. The net result is the dehydration of airway surface with generation of a hyperviscous state. Pharmacological inhibition of this process may improve clearance of airway surface in CF and PCD.

APPROCCIO FARMACOLOGICO PER IL TRATTAMENTO DEL DIFETTO DI BASE NELLA FIBROSI CISTICA E NELLA DISCINESIA CILIARE PRIMARIA

Le cellule epiteliali che rivestono le vie respiratorie hanno un ruolo protettivo fondamentale nei confronti di agenti microbici. Il meccanismo principale di difesa è la "clearance" mucociliare la cui efficacia dipende dal battito ciliare e dalle proprietà chimico-fisiche del fluido periciliare che ricopre le vie aeree. In particolare, le proprietà del fluido dipendono dall'attività di proteine che mediano il trasporto di ioni e che quindi regolano il grado di idratazione e di viscosità nonché il livello di acidità del fluido stesso. Il ruolo protettivo dell'epitelio respiratorio è alterato in due malattie genetiche: la fibrosi cistica (FC) e la discinesia ciliare primaria (DCP). Nella FC, la perdita di funzione della proteina CFTR determina un deficit di trasporto di cloruro e bicarbonato che rende il fluido periciliare eccessivamente acido e disidratato. Nella DCP, è il battito ciliare ad essere compromesso. La conseguenza in entrambi i casi è l'alterazione della clearance mucociliare con colonizzazione batterica, infiammazione cronica e accumulo di muco.

Il nostro obiettivo è lo sviluppo di strategie farmacologiche che migliorino la funzione mucociliare nella FC e nella DCP. Per questo obiettivo generale ci proponiamo di: i) sviluppare nuovi agenti farmacologici per il recupero della funzione di CFTR; ii) identificare composti in grado di correggere il difetto di base causato da mutazioni nonsense, presenti sia nella FC che nella DCP; iii) promuovere la funzione mucociliare attraverso la modulazione di bersagli alternativi.

In collaborazione con la Prof.ssa Paola Barraja (Università di Palermo), stiamo procedendo all'ottimizzazione di una nuova classe di correttori farmacologici del difetto di maturazione della proteina CFTR causato da F508del e altre mutazioni FC. Attraverso lo screening di una collezione di 9000 composti chimici con un saggio funzionale, stiamo cercando inibitori del meccanismo di "nonsense-mediated RNA decay" (NMD) che limita il recupero funzionale di geni colpiti da mutazioni nonsense. Tali composti potranno essere utili sia per FC che per PCD. Infine, abbiamo recentemente scoperto che IL-17, una citochina con un importante ruolo nella risposta anti-batterica delle vie aeree, ha un particolare effetto negativo sulla funzione mucociliare. L'analisi del meccanismo d'azione di IL-17 ha rivelato che l'aumento di espressione del canale del sodio ENaC, della pompa protonica ATP12A e dello scambiatore anionico SLC26A4 ha un ruolo importante nel determinare l'aumento di viscosità del fluido periciliare. Inibitori farmacologici di tali proteine di membrana potrebbero migliorare le proprietà del fluido che ricopre gli epitelii sia nella FC che nella PCD.

Disease Name:

Cystic fibrosis

Nome malattia:

Fibrosi cistica

Project number:

TGM22CBDM10

174. CRISPR/CAS-MEDIATED BASE EDITING: A PROMISING TOOL FOR DISEASE MODELING AND PERSONALIZED MEDICINE APPROACHES FOR PRIMARY CILIARY DYSKINESIA

Gabellini C.^[2], Lai M.^[3], Perotti I.^[2], De Carli A.^[3], Maj D.^[1], Erica Lucia C.^[2], Pistello M.^[3], Pifferi M.^[1]

^[1]Department of Pediatrics Pulmonology and Allergology Section, University Hospital of Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[2]Unit of Cell and Developmental Biology, Department of Biology, University of Pisa ~ Pisa ~ Italy, ^[3]Retrovirus Center, Virology Section, Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa ~ Pisa ~ Italy

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder caused by an alteration in the structure and the movement of cilia. The most recurrent symptoms are respiratory tract infections, situs inversus and infertility. This disease is caused by mutations in at least 50 genes, including SPAG1 and CFAP300 which encode for proteins essential for assembly of dynein arms. The aim of this study is to exploit CRISPR/Cas9-mediated base editing for personalized therapy to treat individuals affected by PCD.

First, we created and characterized loss of function mutants of SPAG1 and CFAP300 gene orthologues in the teleost zebrafish, exploiting the CRISPR/Cas9 gene editing technique. Indeed, zebrafish embryos present several organs containing motile cilia, and this makes it an ideal animal model for the study of PCD. Furthermore, most of the genes associated with PCD have an orthologue in zebrafish.

The CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes, including the endonuclease Cas9 and guide RNAs (crRNA:tracrRNA) targeting the zebrafish orthologs spag1a and spag1b as well as cfap300, have been microinjected into the zebrafish zygotes and the efficacy of induced mutagenesis was verified on mosaic embryos at 48 hours post-fertilization. CRISPANT embryos show phenotypes previously reported for PCD-causing mutations in genes encoding cytoplasmic proteins, including curved body and microcephaly. In addition, we observed altered heart looping in spag1a/spag1b CRISPANT embryos, with increased looping angle, as demonstrated by in situ hybridization using cmcl2 probe. Interestingly, we set up the recording of cilia beating in the olfactory bulbs of zebrafish larvae at 4 days post-fertilization, demonstrating altered frequency of cilia beating in mutant larvae. These results suggest that zebrafish mutants may resemble some features showed by individuals affected by PCD.

In addition, we are trying to create in zebrafish the same CFAP300 mutation of a patient affected by PCD setting up the CRISPR/Cas9-derived strategy of base editing using a zebrafish-optimized base editor (zAncBE4max), to create targeted C-to-T base substitution. The system consists of deaminase APOBEC1, Cas9n D10A nickase, two uracil DNA glycosylase inhibitors and a bipartite NLS at both ends. A similar approach has been also tested ex-vivo by transducing patient-derived airway epithelial cells with adeno-associated vectors bearing the base editing system to revert PCD mutations into their wild-type counterparts.

In conclusion, CRISPR/Cas9-mediated base editing system would be exploited to generate a zebrafish-based personalized disease model of a PCD patient, to create a sort of "avatar" of

individual patients that can be used to draw new targeted therapeutic approaches. On the other hand, it can be used prospectively to correct the specific mutation carried by individuals affected by PCD, paving the way for a personalized therapeutic approach.

La discinesia ciliare primaria (PCD) è una rara malattia genetica causata da un'alterazione della struttura e del movimento delle ciglia, appendici cellulari mobili che rivestono diversi apparati, tra cui quello polmonare. I sintomi più ricorrenti sono le infezioni delle vie respiratorie, inversione degli organi interni come il cuore e l'infertilità. Questa malattia è causata da mutazioni in almeno 50 geni, tra cui SPAG1 e CFAP300, che codificano per le proteine essenziali per l'assemblaggio della componente motrice delle ciglia.

Lo scopo di questo studio è di valutare il possibile utilizzo di un nuovo sistema di modificazione genetica mirata denominato "base editing" al fine di identificare una terapia personalizzata per il trattamento di individui affetti da PCD. In primo luogo, abbiamo valutato la possibilità di utilizzare un modello animale a basso impatto etico, il pesce teleosteo "zebrafish" o pesce zebra, al fine di studiare nel dettaglio gli effetti della perdita di funzione dei geni orologi di SPAG1 e CFAP300, sfruttando la tecnica di editing genico CRISPR/Cas9. Infatti, gli embrioni di zebrafish presentano diversi organi contenenti ciglia mobili, e questo lo rende un modello animale ideale per lo studio della PCD. Abbiamo osservato che i modelli mutanti mosaico per i suddetti geni, denominati "CRISPanti", mostrano un'alterazione dello sviluppo cardiaco e del battito delle ciglia nel bulbo olfattivo, caratteristiche riconducibili a quelle osservate nei pazienti affetti da PCD.

Stiamo inoltre cercando di creare in zebrafish la stessa mutazione di un paziente affetto da PCD utilizzando la tecnica del base editing, per creare una sostituzione nucleotidica mirata. Un approccio simile è stato anche testato ex-vivo trasducendo cellule epiteliali delle vie aeree derivate da un paziente affetto da PCD con vettori virali adeno-associati recanti il sistema di base editing, per intervenire sulle mutazioni responsabili della malattia al fine di ripristinare le sequenze corrette. In conclusione, il sistema di base editing potrebbe permettere in futuro di generare un modello di malattia personalizzato basato su zebrafish, per creare una sorta di "avatar" dei singoli pazienti affetti da PCD che potrebbe essere utilizzato per disegnare nuovi approcci terapeutici mirati. D'altra parte, il sistema di base editing potrebbe essere utilizzato come approccio terapeutico personalizzato, correggendo le mutazioni specifiche presenti in individui affetti da PCD, al fine di ripristinare la corretta struttura e funzione delle ciglia.

Disease Name:

Primary Ciliary Diskinesia

Nome malattia:

Discinesia Ciliare Primaria

Project number:

GSA21C011

Genetic skin disease

175. NOVEL THERAPEUTIC APPROACHES FOR AEC SYNDROME

Di Girolamo D.*^[1], D'Auria L.^[1], Urciuoli G.^[3], Antonini D.^[2], Missero C.^[1]

^[1]Università degli studi di Napoli Federico II - CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore ~ Napoli ~ Italy,

^[2]University of Naples Federico II ~ napoli ~ Italy, ^[3]CEINGE- Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore ~ Napoli ~ Italy

AEC syndrome is characterized by long-lasting skin erosions for which there is no effective treatment. The disorder is caused by specific mutations in the p63 gene encoding a crucial pioneer transcription factor required for epidermal gene expression. We previously demonstrated that AEC p63 mutations cause protein misfolding and aggregation, thus exerting a dominant negative effect. The main objective of this project is to establish the efficacy and safety of therapeutic strategies for AEC syndrome to resolve skin erosions in vivo or ex-vivo in combination with cell therapy. Using a novel mouse model, we demonstrated the efficacy and safety of an exon-skipping approach. Currently we are developing a safe strategy for gene correction in human primary keratinocytes with a single set of reagents for all AEC mutations, greatly simplifying future therapeutic intervention. Here, we show that with a highly efficient and non-toxic viral-free method, we can achieve more than 90% correction of p63 protein function in seventy-two hours ex vivo, without affecting the clonogenic potential of human primary keratinocytes. In parallel, we are validating small molecules that we have recently identified in a high throughput screening to alleviate the detrimental effects of AEC mutant p63. The proposed state-of-the-art technologies for genome editing in epidermal stem cells and the use of small molecules that are capable of reactivating mutant p63 will greatly contribute to cure untreatable skin erosion in AEC syndrome

La sindrome AEC o sindrome di Hay-Wells è caratterizzata da erosioni cutanee di lunga durata per le quali non esistono trattamenti efficaci. La patologia è causata da specifiche mutazioni nel gene p63 che codifica per un fattore fondamentale per la pelle. L'obiettivo di questo progetto è dimostrare l'efficacia e la sicurezza delle strategie terapeutiche per la sindrome AEC per curare le erosioni cutanee. Utilizzando un nuovo modello murino, abbiamo dimostrato l'efficacia e la sicurezza di un approccio che prevede una modifica genetica. Attualmente stiamo sviluppando una strategia sicura per la correzione genica nei cheratinociti primari umani con un singolo set di reagenti per tutte le mutazioni AEC, semplificando notevolmente il futuro intervento terapeutico. In questo lavoro dimostriamo che con un metodo altamente efficiente e non tossico, possiamo ottenere una correzione del gene mutato superiore al 90% in poche ore e su cellule umane della cute, cosa che permetterà in futuro di trattare e risolvere le erosioni cutanee. Parallelamente, stiamo validando piccole molecole che abbiamo recentemente identificato in uno screening ad alto rendimento per alleviare gli effetti dannosi delle mutazioni.

Le tecnologie all'avanguardia proposte di modifica del genoma nelle cellule staminali epidermiche e l'uso di piccole molecole in grado di riattivare il gene mutante contribuiranno notevolmente a curare le erosioni cutanee nella sindrome AEC

Disease Name:

AEC Syndrome

Nome malattia:

Sindrome AEC (Sindrome di Hay-Wells)

Project number:

GGP20124

176. A FUNCTIONAL GENOMICS FRAMEWORK TO INVESTIGATE THE MOLECULAR BASES OF RARE GENETIC DISEASES

Vaccaro L.*^[1], Panariello F.^[1], Grimaldi A.^[1], Manfredi A.^[2], Cacchiarelli D.^[1]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli (NA) ~ Italy, ^[2]Next Generation Diagnostics ~ Pozzuoli (NA) ~ Italy

The improvement of novel sequencing technologies is quickly transforming the scientific investigation and the therapeutic treatments of rare genetic diseases, which research is hampered by the limited cohort of diagnosed patients and by the difficulty to evaluate the effect of Variants of Unknown Significance (VUS). In silico predictors represent the gold standard of clinical entities for the interpretation of mutations identified through sequencing approaches(1). Unfortunately, a high number of them are classified as VUS, leading to wrong diagnoses and inadequate treatment of patients(2). To address this point, MITE (Mutagenesis by Integrated TlEs)(3) is a novel saturation mutagenesis technique that allows to easily test thousands of potentially pathogenic protein variants in a single high throughput biological assay. MITE has already been widely applied in cancer research to study the effect of missense mutations in many oncogenes such as P53(4), PTEN(5), ERK2(6), but its potential in the field of rare genetic diseases has not yet been fully exploited(7). As a proof of principle, we decided to apply it to mutagenize two regions (a portion of the DNA Binding Domain and the SAM domain, known hotspots of EEC- and AEC-Syndrome(8,9)) of P63, a transcription factor which, besides its oncogenic function, is mainly involved in skin development as regulator(10,11). To follow the biological activity of each generated variant, we set up a highly efficient conversion strategy from fibroblasts to keratinocytes-like-cells (through P63-KLF4 induction)(12). By using the specific keratinocytes membrane antigen ITGβ4, we were able to separate the converted and non-converted cells, study the enrichment of each variant in the different populations and rank them according to their pathogenic effect. We finally aim to the development of a functional genomics platform to expand such method to any other disease driving gene. Through this approach, we leverage a specific signature to associate each phenotype to a specific physiological or pathological activity of a certain variant. In conclusion, this tool could represent a milestone in the field of genetic disorders, providing the scientific community a strong (and easy to use) functional tool to explore the molecular bases of rare diseases

Lo sviluppo delle nuove tecnologie di sequenziamento sta rivoluzionando profondamente la ricerca scientifica e il trattamento delle malattie genetiche rare, la cui ricerca è rallentata dal numero limitato di pazienti e dalla difficoltà di valutare l'effetto delle cosiddette varianti di significato incerto (in inglese Variants of Uncertain Significance, VUS). I predittori in silico rappresentano, ad oggi, lo standard di riferimento delle autorità cliniche per l'interpretazione delle mutazioni identificate tramite approcci di sequenziamento. Sfortunatamente, la maggior parte di tali mutazioni sono classificate come VUS, portando ad una diagnosi sbagliata e ad un trattamento del paziente inadeguato. Per risolvere questo problema, il MITEseq è una innovativa tecnica di mutagenesi a saturazione sito-diretta che permette di testare migliaia di varianti potenzialmente patologiche in un singolo esperimento. Come prova del potenziale di questa tecnica nel campo delle malattie rare, abbiamo deciso di applicarlo per mutagenizzare due regioni (una porzione del dominio di legame al DNA e l'intero dominio SAM) di P63, un fattore di trascrizione che, nonostante un coinvolgimento in alcuni tumori, è principalmente responsabile della regolazione dello sviluppo dell'epidermide. Per valutare l'attività biologica di ogni variante generata con il MITE, abbiamo sviluppato un protocollo di conversione da fibroblast a cheratinociti molto efficiente guidato dall'espressione di P63 e KLF4 (un altro fattore di trascrizione). Utilizzando una specifica proteina di membrana come marker della conversione, abbiamo potuto separare le cellule convertite da quelle non convertite, studiare l'arricchimento di ogni variante nelle due popolazioni e classificarle secondo il loro effetto potenzialmente patologico. Infine, stiamo sviluppando una piattaforma di genomica funzionale che ci permetta di espandere facilmente questo approccio a qualsiasi altro gene-malattia. Attraverso questo approccio, possiamo utilizzare una specifica caratteristica

comune ai nostri campioni che ci permette di associare ogni fenotipo osservato ad una specifica attività fisiologica o patologica della specifica variante che testiamo. In conclusione, questo strumento potrebbe rappresentare una pietra miliare nel campo delle malattie genetiche, fornendo alla comunità scientifica una piattaforma solida e facile da applicare per esplorare le basi molecolari delle malattie genetiche rare.

Disease Name:

AEC Syndrome; EEC Syndrome

Nome malattia:

Sindrome AEC (Sindrome di Hay-Wells); Sindrome EEC

Project number:

TGM22GM01

177. ALLELE-SPECIFIC CRISPR-ENGINEERED CPF1 GENOME EDITING TO TREAT OCULAR SURFACE DISORDER IN ECTRODACTYLY-ECTODERMAL DYSPLASIA-CLEFTING (EEC) SYNDROME

Conci A.*^[1], Fabrizi A.^[2], Marini G.^[1], Paiardini A.^[3], Latella M.C.^[2], Laura D.R.^[2], De Luca M.^[1]

^[1]University of Modena and Reggio Emilia ~ Modena ~ Italy, ^[2]Holostem Terapie Avanzate ~ Modena ~ Italy,

^[3]Università di Roma "La Sapienza" ~ Roma ~ Italy

Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft (EEC) syndrome is an autosomal dominant disease caused mainly by point mutations in the TP63 gene, characterized by a triad of ectrodactyly, ectodermal dysplasia and facial clefting together with a wide spectrum of other clinical manifestations (e.g. corneal blindness). Surgery can improve some aspects of patients' lives, but the main unmet medical need remains blindness, caused by corneal opacification due to limbal stem cell deficiency. This project focuses on ex-vivo correction of patients' mutations with an engineered allele-specific CRISPR-nuclease. To this end, we are using a structure-guided mutagenesis approach to engineer CRISPR-nuclease to tackle EEC-causing point mutations. p63mut allele-specific knock-out should allow us to restore normal p63 activity in patient primary human cells. Given that p63 plays a key role in regulating all squamous epithelia and has high homology to p53, it is necessary to maximize the custom-designed nuclease for both editing efficiency and specificity toward the mutated allele only, and to reduce its off-target activity. Since EEC syndrome is a rare disease, we are establishing a biallelic EEC cellular model for the validation of our engineered CRISPR system. The validation of this cellular model will serve as a first step to set up an ex-vivo gene therapy for the corneal damage of EEC patients and to validate this approach in patient's primary cells.

Gene-editing allele specifico mediato da CRISPR-Cpf1 ingegnerizzate per il trattamento delle patologie oculari
nella sindrome da Ectrodattilia-displasia ectodermica-labiopalatoschisi (EEC)

La sindrome EEC è una rara malattia genetica caratterizzata dall'associazione di ectrodattilia ("mano a chela di granchio") e anomalie del palato e di altri tessuti di derivazione ectodermica (tessuto nervoso, tessuti epiteliali di rivestimento e annessi come capelli, unghie, ecc.). La patologia è a trasmissione dominante e nella maggior parte dei casi (oltre il 90%) è dovuta a mutazioni nel gene TP63, che codifica per una proteina (p63) essenziale per lo sviluppo e il mantenimento di diversi epiteli di rivestimento tra cui l'epidermide e l'epitelio corneale. Gran parte dei pazienti con EEC presenta, infatti, difetti corneali legati alla perdita progressiva delle cellule

staminali responsabili della rigenerazione costante della superficie oculare, indispensabile per mantenere la trasparenza della cornea e la capacità visiva. Il progetto si propone di studiare un nuovo approccio terapeutico per curare la progressiva opacizzazione della cornea e la perdita di vista che ne consegue (che incide fortemente sulla qualità della vita di questi pazienti e costituisce uno dei sintomi più gravi della malattia) utilizzando un innovativo sistema di editing genetico in grado di correggere il gene malato e ripristinare il corretto funzionamento di p63.

Disease Name:

EEC Syndrome

Nome malattia:

Sindrome EEC

Project number:

GGP20088

178. ANTIBODY GENE TRANSFER TREATMENT IMPROVES EPIDERMAL PATHOLOGY IN A MOUSE MODEL OF KID SYNDROME

Peres C.*^[1], Sellitto C.^[2], Nardin C.^[1], Putti S.^[1], Orsini T.^[1], Di Pietro C.^[1], Marazziti D.^[1], Vitiello A.^[3], Calistri A.^[3], Rigamonti M.^[4], Scavizzi F.^[1], Raspa M.^[1], Zonta F.^[5], Yang G.^[5], White T.^[2], Mammano F.^[1]

^[1]Istituto di Biochimica e Biologia Cellulare - CNR ~ Monterotondo, Rome ~ Italy, ^[2]Department of Physiology and Biophysics, Stony Brook University. ~ Stony Brook, NY ~ United States of America, ^[3]Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova ~ Padova ~ Italy, ^[4]Tecniplast SpA ~ Buguggiate, Varese ~ Italy, ^[5]Shanghai Institute for Advanced Immunochemical Studies, ShanghaiTech University ~ Shanghai ~ China

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 pathological connexin 26 (Cx26) variants generate “leaky” or abnormally active hemichannels that are causally linked to keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome, a devastating disease for which there is no cure [1]. We previously showed that submicromolar concentrations of a human-derived monoclonal antibody (mAb), named abEC1.1, inhibit KID-related leaky Cx26 hemichannels in vitro [2,3].

Here, we performed abEC1.1 gene transfer experiments in vivo based on a recombinant AAV vector in a well characterized mouse model of KID syndrome. In this model, the inducible expression of the p.G45E variant in the epidermis of heterozygous transgenic Cx26G45E mice leads to skin abnormalities within few days of doxycycline administration [4, 5]. We developed an ad hoc technology based on ratiometric reflectance imaging in live animals and determined that a single systemic administration of the abEC1.1 AAVmAb significantly reduces the visible manifestation of epidermal pathology for up to 4 weeks.

We also performed imaging of DAPI uptake by multiphoton intravital microscopy[6] and showed that treatment acted at the level of the mutant hemichannels expressed in epidermal keratinocytes after doxycycline induction. Finally, we examined treatment effects ex vivo, by histology and confocal immunofluorescence microscopy of mouse skin. We found that abEC1.1 AAVmAb recovered a normal epidermal thickness and keratinocytes size. It also caused partial recovery of the expression pattern of epidermal keratins and reduction of proliferation and apoptosis markers. Prolonged exposure to mAb had no effect on gap junction formation in liver and brain and did not affect locomotion activity, body weight, food or water consumption of treated mice up to 4 months after AAVmAb injection.

These results in preclinical settings prove the efficacy of the AAVmAb-based treatment in the KID

syndrome mouse model, support the clinical potential of our approach and pave the way to the development of innovative therapy to treat connexin-related human genodermatoses by mAbs targeting the extracellular domain of hemichannels.

UN APPROCCIO TERAPEUTICO PER LA SINDROME DA CHERATITE-ITTIOSI-SORDITÀ (KID)

Stato dell'arte antecedente a questo studio:

Le mutazioni della connessina26 (Cx26 o GJB2) che causano un' aumentata attività degli emicanali sono alla base di malattie della pelle che includono la sindrome cheratite-ittiosi-sordità (KID). Per malattie come la sindrome KID, non esiste una cura, ci sono opzioni limitate per la palliazione e l'impatto combinato di perdita dell'udito, deturpazione e cecità diminuisce notevolmente la qualità della vita delle persone colpite che sopravvivono all'infanzia.

Valore aggiunto di questo studio:

In questo studio, abbiamo dimostrato che la patologia epidermica può essere alleviata in un modello murino che replica la malattia della pelle associata alla sindrome KID umana mediante somministrazione sistemica di un anticorpo monoclonale. Abbiamo dimostrato che l'effetto terapeutico dell'anticorpo si esplica mediante il blocco degli emicanali della Cx26.

Ulteriori implicazioni:

Questi risultati (1) confermano l'ipotesi che l'aumento dell'attività degli emicanali contribuisca in modo significativo alla patologia epidermica nella sindrome KID e (2) mostrano il potenziale uso di specifici anticorpi monoclonali come nuovo intervento terapeutico per il trattamento di questa malattia. La disfunzione degli emicanali contribuisce all'insorgenza di numerose altre malattie, pertanto questi risultati potrebbero avere un ampio impatto per il trattamento di diversi stati patologici dipendenti dagli emicanali.

Disease Name:

Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome

Nome malattia:

Sindrome da cheratite-ittiosi-sordità

Project number:

GGP19148

179. VASCULAR EHLERS-DANLOS SYNDROME DERMAL FIBROBLASTS' TRANSCRIPTOME: PATHOMECHANISMS AND TARGETABLE MOLECULES

Ritelli M.^[1], Cinquina V.^[1], Bertini V.^[1], Zoppi N.^[1], Venturini M.^[2], Colombi M.^[1], Chiarelli N.*^[1]

^[1]Division of Biology and Genetics, Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia ~ Brescia ~ Italy, ^[2]Division of Dermatology, Department of Clinical and Experimental Sciences, Spedali Civili University Hospital Brescia ~ Brescia ~ Italy

Vascular Ehlers-Danlos syndrome (vEDS) is a rare inherited connective tissue disorder caused by mutations in the COL3A1 gene encoding type III collagen, which is mainly expressed in blood vessels and hollow organs, thus, explaining why its reduction leads to fragility of soft connective tissues with arterial and organ ruptures. Current treatment is only symptomatic and surgical intervention is limited due to friable and fragile tissues. From a biological point of view, the functional consequences of COL3A1 mutations on gene expression changes and related perturbed processes associated with the vEDS pathogenesis are poorly understood.

Within the ongoing funded project, until now a targeted whole-transcriptome analysis (RNA-seq) on a large cohort of dermal fibroblasts derived from 18 molecularly characterized vEDS patients and 36 healthy individuals was performed. By applying an ANOVA test with an FDR-adjusted p-value \leq

0.05 and a fold-change threshold of ± 1.5 , we identified in patient vs. control cells a total of 3,189 differentially expressed genes (DEGs), 3,067 of which were protein-coding RNAs (mRNAs) and 122 non-coding RNAs (ncRNAs). 2,618 of these DEGs were downregulated (2,538 mRNAs, 80 ncRNAs) and 571 upregulated (529 mRNAs, 42 ncRNAs). Gene Ontology-based functional classification of DEGs revealed an enrichment of several biological functions mainly related to regulation of cell cycle, chromatin remodeling, mRNA processing/splicing, translation, protein transport, and autophagy. To uncover enriched perturbed pathways, we performed DEGs enrichment/depletion analysis with the Cytoscape software. The most interconnected biological network was related to cellular response to stress, followed by proteostasis and cellular catabolic processes including ubiquitin-mediated proteolysis, autophagy, and endocytosis. These RNA-seq data corroborate and expand previous findings from our research group on vEDS dermal fibroblasts, which demonstrated that COL3A1 mutations lead to a significant impairment of the extracellular matrix structural integrity by perturbing different cellular processes such as collagen biosynthesis/processing and organization, protein folding quality control, and endoplasmic reticulum homeostasis. Currently, we are carrying out miRNA sequencing of vEDS and control samples with the aim to reconstruct the dysregulated mRNA-ncRNA/miRNA network. Deciphering this intricate RNAs interaction hub should provide further evidence on potential disease biomolecules, paving the way for future investigations on related targetable pathways that may assist the discovery of effective treatment strategies for patients' management.

Studio dei meccanismi patogenetici e identificazione di nuovi target nella sindrome di Ehlers-Danlos vascolare, attraverso analisi trascrittomiche in fibroblasti cutanei dei pazienti

La sindrome di Ehlers-Danlos vascolare (vEDS) è una malattia ereditaria rara del tessuto connettivo a trasmissione autosomica dominante, causata da mutazioni nel gene COL3A1 che è responsabile della produzione del collagene di tipo III (COLLIII), che è presente principalmente nei vasi sanguigni e negli organi cavi. Mutazioni nel gene COL3A1 causano una riduzione nella produzione di questo tipo di collagene, che porta a una maggiore predisposizione alla formazione di ecchimosi, alla rottura di arterie o delle pareti dell'intestino e, nelle donne, dell'utero durante la gravidanza e il parto. Il trattamento principale per i pazienti vEDS è sintomatico (prevenzione vascolare), ma non risolutivo. Nonostante il difetto di sintesi, maturazione e organizzazione di COLLIII nei tessuti connettivi sia considerato la causa principale della loro estrema fragilità dei tessuti connettivi dei pazienti, vi sono ancora limitate conoscenze sui meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi della vEDS. Questo progetto si prefigge di colmare questo vuoto attraverso l'analisi del profilo di espressione globale dell'RNA (trascrittoma). Sfruttando il sequenziamento di nuova generazione (RNA-seq), abbiamo analizzato sia i geni codificanti proteine (RNA messaggero, mRNA) che quelli non codificanti (lunghi e piccoli RNA, lncRNA e miRNA). L'analisi del trascrittoma è stata eseguita su fibroblasti dermici sia di un ampio numero di pazienti vEDS che di donatori sani. Finora abbiamo identificato migliaia di geni sia codificanti proteine che non codificanti (mRNA, lncRNA, miRNA), che mostrano un'espressione alterata nelle cellule vEDS rispetto a quelle di individui sani e abbiamo definito i principali processi biologici perturbati da questi geni differenzialmente espressi. Sono in corso analisi bioinformatiche per integrare tutte le informazioni derivanti dall'analisi del trascrittoma globale, che forniranno un quadro dettagliato delle alterazioni dell'espressione genica e dei relativi processi biologici perturbati dalla perdita di funzione del gene COL3A1. Chiarire la funzione biologica e l'impatto funzionale delle diverse specie di RNA nei meccanismi patogenetici della vEDS dovrebbe consentire l'identificazione di molecole biologiche coinvolte nella patologia. In una visione traslazionale, questi risultati potrebbero essere alla base di ricerche future volte all'identificazione di potenziali bersagli molecolari per sviluppare strategie terapeutiche efficaci per la gestione dei pazienti.

Disease Name:

Vascular Ehlers-Danlos syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Ehlers-Danlos vascolare

Project number:

GSA21F001

Genetic systemic or rheumatologic disease

180. MIR22HG EXPRESSION PROFILE IN DIFFERENT CELL POPULATIONS FROM OLIGOARTICULAR JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS PATIENTS

Pelassa S.^[1], Raggi F.^[1], Rossi C.^[1], Cangelosi D.^[1], Taverna D.^[2], Civino A.^[3], Filocamo G.^[4], Bosco M.C.^[1], Consolaro A.^[1]

^[1]IRCCS Istituto G.Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[2]University of Turin ~ Turin ~ Italy, ^[3]Ospedale Vito Fazzi ~ Lecce ~ Italy,

^[4]Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milano ~ Italy

Background/Rationale

Oligoarticular Juvenile Idiopathic Arthritis (OJIA) is a rare pediatric chronic inflammatory arthritis whose causes remain mostly unknown. It comprises two phenotypes with different outcome: persistent (p)OJIA, more benign and likely to achieve complete remission, and extended (e)OJIA, often erosive and treatment refractory. There are no validated biomarkers able to predict disease extension. Recent findings point to a causal role for MIR22 Host Gene (MIR22HG) in the pathogenesis of adult arthritides and suggest its potential as a biomarker and therapeutic target in these diseases. No information is available on MIR22HG expression and function in OJIA.

Objectives

This proposal aims at investigating MIR22HG expression profile in different cell populations from peripheral blood (PB) and synovial fluid (SF) of newly diagnosed OJIA patients. MIR22HG role in inflammation and joint damage and potential as a molecular marker of early disease diagnosis and progression and/or a target for therapeutic intervention will be studied by assessing: 1) the correlation of its expression profile with clinical parameters; 2) its functions in cell pro-inflammatory and destructive activities; 3) its mechanism of action via miRNA deregulation

Methods

MIR22HG mRNA expression was analyzed by RT-qPCR in monocytes (Mn) and Lymphocytes (Ly) isolated from PB (PBMC) of 4 patients with OJIA at disease onset by Ficoll and enriched using magnetic beads.. SF-derived fibroblast-like synoviocytes (FLS) were isolated from 2 patients by adhesion to plastic and phenotypically characterized using anti-CD45, anti-CD90, and anti-Podoplanin (PDPN) antibodies. As a control, we analyzed MIR22HG mRNA expression in Mn and Ly from PB samples of age/gender matched control children and in human Mn cell lines. Results of MIR22HG expression analysis were then correlated with patients' clinical parameters.

Results

We showed high MIR22HG expression levels in monocytic cell lines that were upregulated upon stimulation with LPS, IFN γ , and hypoxia.

Higher MIR22HG expression was detected in patient-derived Mn respect to Ly. Analysis of correlation with patients' clinical data suggests that MIR22HG mRNA levels at disease onset are higher in Mn from patients developing a persistent respect to an extended course assessed at 1 year follow up.

FLS isolated from patient's synovial fluid were CD45-/CD90+/PDPN+, consistent with the phenotype of FLS originating from the sublining region of the synovial membrane, known for they role in directing the immune response in arthritis. MIR22HG was found to be expressed in isolated FLS.

Conclusions

In conclusion, we demonstrated induction of MIR22HG expression in Mn cell lines by proinflammatory stimuli typical of the OJIA joint environment and in Mn, LY, and FLS populations isolated from OJIA patients at onset, with differences in the extent of expression observed in Mn from patients with different courses at follow up.

Espressione di MIR22HG nelle cellule di pazienti affetti da Artrite Idiopatica Giovanile Oligoarticolare

Introduzione

L'artrite idiopatica giovanile oligoarticolare (AIGO) è una rara forma infiammatoria cronica pediatrica. L'AIGO può portare ad esiti differenti: AIGO persistente, più benigna e spesso con remissione completa, ed AIGO estesa, più grave e resistente al trattamento. Purtroppo, non esistono biomarcatori validati in grado di prevedere l'estensione della malattia. Recenti scoperte mostrano il possibile ruolo di MIR22 Host Gene (MIR22HG) nell'artrite degli adulti suggerendone il potenziale come biomarcatore e bersaglio terapeutico. Ad oggi, non sono disponibili dati sull'espressione e la funzione di MIR22HG nell'AIGO.

Obiettivi

Questo studio mira a studiare l'espressione di MIR22HG in diverse popolazioni cellulari da sangue periferico (PB) e da liquido sinoviale (SF) di pazienti con AIGO all'esordio. Analizzeremo anche il ruolo di MIR22HG nell'infiammazione e nel danno articolare e il suo potenziale come biomarcatore per la diagnosi precoce e la predizione della progressione della malattia valutando: 1) la correlazione tra espressione e i parametri clinici dei pazienti 2) il ruolo nelle attività proinfiammatorie cellulari 3) il meccanismo d'azione.

Metodi

L'espressione dell'mRNA di MIR22HG è stata analizzata mediante RT-qPCR in monociti (Mn) e linfociti (Ly) isolati da PB di 4 pazienti con AIGO all'esordio. Sinoviociti (FLS) sono stati isolati da SF di 2 pazienti mediante adesione e caratterizzati utilizzando anticorpi anti-CD45, anti-CD90 e anti-Podoplanina (PDPN). Come controllo, è stata analizzata l'espressione dell'mRNA di MIR22HG in Mn e Ly derivati da PB di bambini sani e in linee cellulari monocitiche. I risultati dell'analisi dell'espressione di MIR22HG sono stati quindi correlati con i parametri clinici dei pazienti.

Risultati

Abbiamo dimostrato alti livelli di espressione di MIR22HG nelle linee cellulari Mn umane stimolate con LPS, IFN γ e ipossia. Una maggiore espressione di MIR22HG è stata rilevata in Mn rispetto a Ly derivati dal paziente. L'analisi della correlazione con i dati clinici dei pazienti suggerisce che, ad 1 anno di follow-up, i livelli di mRNA di MIR22HG all'esordio della malattia sono più alti in Mn di pazienti che sviluppano un decorso meno aggressivo. I FLS isolati dal liquido sinoviale risultano CD45-/CD90+/PDPN+, mostrando il fenotipo caratteristico di FLS derivati dall'area interna del tessuto sinoviale, noti per il loro ruolo nel dirigere la risposta immunitaria nell'artrite. MIR22HG è espresso anche nei FLS isolati da SF dei pazienti

Conclusioni

Abbiamo dimostrato l'induzione dell'espressione di MIR22HG nelle linee cellulari Mn trattate con stimoli proinfiammatori che mimano l'ambiente articolare dell'AIGO e l'espressione di MIR22HG nelle popolazioni di Mn, LY e FLS isolate dai pazienti AIGO all'esordio, con differenze di espressione nei Mn isolati da pazienti con differenti decorsi clinici.

Disease Name:

Oligoarticular Juvenile Idiopathic Arthritis

Nome malattia:

Artrite Idiopatica Giovanile Oligoarticolare

Project number:

GJC21089

Genetic tumor / neoplasia

181. LINGLE-CELL TRANSCRIPTOMICS AND LINEAGE TRACING TO ENABLE PRECISION MEDICINE IN LYNCH-DERIVED COLORECTAL NEOPLASIAS

Franchini M., Arnese R., Gambardella G.*

TIGEM ~ Napoli ~ Italy

Lynch syndrome (LS) is a hereditary autosomal dominant disease caused by a pathogenic variant in a DNA mismatch repair gene that can lead to the early onset of various cancer types, among which colorectal cancer (CRC) prevails. Conversely to other CRC, Lynch-derived CRC lack known targetable biomarkers. Thus, at date, the standard of care for Lynch-derived CRC patients is strictly limited to surgery and chemotherapy associated with relapse and poor overall survival. Thus, there is an urgent need for the development of systematic methods able to identify novel biomarkers of drug response useful to tailor medical treatment to the individual characteristics of each patient affected by Lynch-derived CRC. Here, we coupled scRNA-seq and lineage tracing techniques to develop an innovative tool for identifying transcriptional biomarkers of drug response at single-cell level. Specifically, we used a lentiviral barcode library to label at the mRNA level about 2,000 individual cells of 4 Lynch-derived CRC cell lines and scRNA-seq to simultaneously profile the transcriptome and retrieve the lineage of about 10,000 single cells of each cell line. Next, we performed an in vitro drug screening using a custom library of 29 FDA-approved anticancer molecules targeting most dysregulated pathways in cancer and QuantSeq-flex bulk 3' RNA-seq to retrieve the tolerant cell lineages of each pharmacological treatment. Then, to identify biomarkers of drug resistance, tolerant and sensitive lineages of each drug were retrospectively mapped on single-cell data of each cell line, and differential expression analysis was used to compare the transcriptional profiles of tolerant and sensitive untreated cells. We are now starting to use this data as training for developing a machine learning algorithm will enable drug prediction at single cell level.

La sindrome di Lynch (LS) è una malattia ereditaria autosomica dominante causata da una variante germinale patologica in un gene di riparazione del DNA che può portare all'insorgenza precoce di vari tipi di cancro, tra cui il prevalente il cancro del colon-retto (CCR). Al contrario di altri tumori non familiari al colon-retto, il tumore colon-rettale derivato dalla sindrome di Lynch non ha biomarcatori bersagliabili noti. Pertanto, ad oggi, lo standard di cura per i pazienti con tumore al colon derivato da sindrome Lynch è strettamente limitato con scarso successo all'intervento chirurgico e successive terapie basate sulla chemioterapia. Pertanto, è importante lo sviluppo di nuovi metodi in grado di identificare biomarcatori utili per disegnare il giusto trattamento medico alle caratteristiche individuali di ciascun paziente. In questo progetto, abbiamo sviluppato una nuova metodologia che unisce tecniche di sequenziamento in singola cellula e di barcoding per l'identificazione di nuovi biomarcatori trascrizionale della risposta ai farmaci da utilizzare nell'ambito della sindrome di Lynch.

Disease Name:

Lynch Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Lynch

Project number:

TGM22GM02

Inborn errors of metabolism

182. TREATMENT WITH THE CARDIOLIPIN-TARGETED PEPTIDE ELAMIPRETIDE IMPROVES CARDIAC MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN A MURINE MODEL OF BARTH SYNDROME

Lobasso S.*^[1], Russo S.^[1], De Rasmio D.^[2], Signorile A.^[1], Corcelli A.^[1]

^[1]Department of Translational Medicine and Neuroscience, University of Bari Aldo Moro ~ Bari ~ Italy, ^[2]CNR-Institute of Biomembranes, Bioenergetics and molecular biotechnologies ~ BARI ~ Italy

Barth Syndrome (BTHS) is a rare X-linked disease associated with early-onset cardiomyopathy, skeletal myopathy, neutropenia, and growth retardation. It is caused by loss-of-function mutations of the TFAZZIN gene, which is responsible for remodeling the mitochondrial phospholipid cardiolipin (CL). Deregulation of CL maturation result in a dramatically increased monolysocardiolipin (MLCL)/CL ratio in BTHS mitochondria associated with abnormal membrane ultrastructure and mitochondrial respiratory chain dysfunction. The development of an effective and specific therapy for BTHS patients remains challenging, particularly because of the limited number of diagnosed patients, extraordinary phenotype variability, and unpredictable clinical course. One of the most promising therapeutic approaches includes the CL-targeted tetrapeptide elamipretide (or SS-31), which is hypothesized to improve mitochondrial inner membrane stability and bioenergetic functions.

In this project, we used TFAZZIN knockdown (TazKD) mice to investigate whether in vivo administration of elamipretide could affect mitochondrial phospholipid profiles and dysfunction. The CL fingerprinting of TazKD cardiac mitochondria obtained by MALDI-TOF/MS revealed the typical increased MLCL/CL ratio associated with BTHS. TazKD mitochondria showed lower respiratory rates in states 3 and 4 together with a decreased in maximal respiratory rates. Treatment of TazKD mice with elamipretide improved mitochondrial respiratory capacity and promoted supercomplex organization, without affecting the phospholipid ratio. We hypothesize that the peptide exerts its effect by influencing the function of the respiratory chain rather than affecting CL directly. In conclusion, our results indicate that elamipretide have beneficial effects on improving cardiac mitochondrial dysfunction in a BTHS animal model, suggesting the peptide as future well-suited therapeutic candidate for patients with BTHS.

IL TRATTAMENTO CON ELAMIPRETIDE MIGLIORA LA FUNZIONALITA' MITOCONDRIALE IN UN MODELLO ANIMALE DI SINDROME DI BARTH

La sindrome di Barth (BTHS) è una malattia genetica rara associata a cardiomiopatia ad esordio precoce, miopatia scheletrica, neutropenia e ritardo della crescita. È causata da mutazioni del gene TFAZZINA, che è responsabile della maturazione della cardiolipina (CL), un fosfolipide della membrana mitocondriale con un ruolo chiave per il corretto apporto energetico alle nostre cellule. Il malfunzionamento della proteina tafazzina provoca un rapporto monolisocardiolipina (MLCL)/CL notevolmente aumentato nelle membrane mitocondriali dei pazienti BTHS, che è associato a deficit della produzione energetica da parte della catena respiratoria mitocondriale.

Lo sviluppo di una terapia efficace e specifica per i pazienti con BTHS rimane ancora una sfida, in particolare a causa del numero limitato di pazienti diagnosticati, della straordinaria variabilità del fenotipo e dell'imprevedibile decorso clinico. Uno degli approcci terapeutici più promettenti include il tetrapeptide elamipretide, che si ipotizza possa migliorare le funzioni bioenergetiche mitocondriali proprio stabilizzando la CL.

In questo progetto, abbiamo utilizzato un modello animale di BTHS, ossia topi TFAZZIN knockdown (TazKD) per studiare l'effetto della somministrazione in vivo dell'elamipretide sui

mitocondri cardiaci. Il trattamento con elamipretide dei topi TazKD ha migliorato significativamente sia la capacità respiratoria che l'organizzazione dei supercomplessi mitocondriali.

In conclusione, i nostri risultati hanno rivelato che l'elamipretide ha avuto effetti benefici sul miglioramento della disfunzione mitocondriale cardiaca in un modello animale BTHS, suggerendo tale peptide come futuro candidato terapeutico adatto per i pazienti con BTHS.

Disease Name:

Barth Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Barth

Project number:

GGP19091

183. DOWN REGULATION OF MANNOSE-6-PHOSPHATE RECEPTORS IN FABRY DISEASE CARDIOMYOPATHY. POTENTIAL TARGET FOR ENZYME THERAPY ENHANCEMENT

Frustaci A.^[1], Verardo R.^[1], Scialla R.^[1], Bagnato G.^[1], Verardo M.^[2], Alfarano M.^[3], Russo M.A.^[4]

^[1]Cellular and Molecular Cardiology Lab, IRCCS L. Spallanzani, Rome, Italy ~ Rome ~ Italy, ^[2]Unit of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders, Genetics and Rare Diseases Research Division, Bambino Gesù Children's Hospital, 00146 Rome, Italy; ~ Rome ~ Italy, ^[3]Department of Clinical, Internal, Anesthesiologist and Cardiovascular Sciences, La Sapienza University, 00161 Rome, Italy; ~ Rome ~ Italy, ^[4]MEBIC Consortium, San Raffaele Open University, 00166 Rome, Italy; ~ Rome ~ Italy

Background: Efficacy of enzyme replacement therapy (ERT) in mobilizing globotriaosylceramide (GB-3) from Fabry cardiomyocytes is limited. The mechanism involved is still obscure.

Objective: Evaluation of Mannose-6-phosphate receptor (M6Pr) in causing ERT resistance of Fabry disease cardiomyopathy (FDCM).

Methods: Assessment of M6Pr, M6Pr-mRNA and Ubiquitin has been obtained by Western blot analysis and Real Time PCR, in frozen endomyocardial biopsy samples, from 17 pts with FD and various degree of left ventricular hypertrophy, maximal wall thickening (MWT) from 11.5 and 20 mm. Diagnosis and severity of FDCM followed definition of GLA mutation, α -galactosidase A enzyme activity, cardiac magnetic resonance and left ventricular endomyocardial biopsy with quantification of myocyte hypertrophy and extent of Gb-3 accumulation. All patients have received alpha or beta-agalsidase for ≥ 3 years without reduction of LV mass nor increase of T1 mapping at CMR. Controls were surgical biopsies from 15 patients undergoing mitral valve replacement.

Results: Protein analysis showed mean M6Pr in FDCM to be 5.4-fold lower than in normal heart (4289 ± 6595 vs 23581 ± 4074 , $p=0,0996$) ($p<0.001$): specifically 9- fold lower in male, $p=0.009$, ($p<0.001$) and 3-fold lower in female $p=0.5799$, ($p<0.001$) showing, at histology, mosaic of normal and diseased cells. M6Pr-mRNA expression was normal while ubiquitin showed an increase of 4.6 fold vs controls (13284 ± 1723 vs 2870 ± 690 , $p=0.001$).

Conclusion: M6Pr expression is remarkably reduced in FDCM as likely result of post-translational degradation. It may explain the reduced efficacy of ERT and be a therapeutic target for enhancement of ERT activity.

Titolo: Ridotta espressione del recettore mannosio-6-fosfato nella cardiomiopatia di Anderson Fabry. Potenziale bersaglio per il miglioramento della terapia enzimatica sostitutiva

L'efficacia della terapia enzimatica sostitutiva nella mobilizzazione del globotriaosilceramide (Gb-3) dai cardiomiociti nella cardiomiopatia di Anderson Fabry è limitata. Il meccanismo coinvolto è ancora oscuro.

Obiettivo dello studio è valutare se la riduzione del recettore mannosio-6-fosfato (M6Pr) può causare resistenza alla terapia enzimatica sostitutiva nella cardiomiopatia di Anderson-Fabry.

La valutazione del M6Pr, M6Pr-mRNA e dell'Ubiquitina è stata ottenuta mediante analisi Western blot e Real Time PCR, in campioni biopsici endomiocardici congelati, da 20 pazienti con malattia di Fabry e vari gradi di ipertrofia ventricolare sinistra con ispessimento parietale massimo da 11,5 e 20 mm. La diagnosi e la gravità della cardiomiopatia della malattia di Fabry è stata eseguita con la determinazione della mutazione del gene α -galattosidasi A e il dosaggio dell'attività enzimatica, la risonanza magnetica cardiaca e la biopsia dell'endomiocardio ventricolare sinistra con quantificazione dell'ipertrofia dei cardiomiociti e dell'entità dell'accumulo di Gb-3. Tutti i pazienti hanno ricevuto alfa o beta-galattosidasi per un periodo superiore a 3 anni senza riduzione della massa ventricolare sinistra né aumento del T1 mapping alla risonanza magnetica cardiaca. Come controlli sono state utilizzate biopsie chirurgiche di 20 pazienti sottoposti a sostituzione della valvola mitrale.

L'analisi delle proteine ha dimostrato che l'espressione del M6Pr nella cardiomiopatia di Fabry è 5,4 volte inferiore rispetto al cuore normale (4289 ± 6595 vs 23581 ± 4074 , $p=0,0996$) ($p<0,001$): in particolare 9 volte inferiore nei maschi, $p=0,009$, ($p<0,001$) e 3 volte inferiore nella femmina $p=0,5799$, ($p<0,001$) mostrando, all'istologia, un mosaico di cellule normali e malate. L'espressione del M6Pr-mRNA era normale mentre l'ubiquitina mostrava un aumento di 4,6 volte rispetto ai controlli (13284 ± 1723 vs 2870 ± 690 , $p=0,001$).

Conclusione: L'espressione del M6Pr è notevolmente ridotta nella cardiomiopatia di Fabry come probabile risultato del degradazione post-traduzionale. Questo potrebbe spiegare la ridotta efficacia della terapia enzimatica sostitutiva ed essere un bersaglio terapeutico per il potenziamento dell'attività stessa.

Disease Name:

Fabry Disease

Nome malattia:

Malattia di Fabry

Project number:

GGP17055

184. LIVER-DIRECTED PROMOTERLESS GENE TARGETING WITHOUT THE USE OF NUCLEASES AS A POTENTIAL THERAPY FOR FABRY DISEASE

Saxena H.^[2], Biasizzo J.^[1], Domenis R.^[1], Zentilin L.^[2], Dardis A.^[3], Muro A.F.^[2]

^[1]Institute of Clinical Pathology, Department of Laboratory Medicine, University Hospital of Udine ~ Udine ~ Italy,

^[2]International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) ~ Trieste ~ Italy, ^[3]Regional Coordinator Centre for Rare Diseases, University Hospital of Udine ~ Udine ~ Italy

Fabry disease (FD) is an X-linked inherited, lysosomal storage disorder caused by mutations in the Alpha Galactosidase-A (GLA) gene encoding for GLA enzyme responsible for catabolism of glycosphingolipids like Globotriaosylceramide (Gb3). Accumulation of Gb3 in lysosomes results in systemic clinical manifestations and reduced lifespan. Enzyme Replacement Therapy (ERT) and chaperone therapy are the available treatments for FD however, noncurative and with limitations.

We developed a potential therapeutic approach based on the permanent genetic modification of hepatocytes to express the hGLA enzyme by targeting the albumin locus in vivo. Juvenile P30 Fabry KO mice were treated with 3.0×10^{13} vg/kg of an AAV8 donor vector containing mAlb homology arms and the hGLA cDNA and were sacrificed 4 months post-treatment. This integrative approach resulted in enhanced plasma GLA activity in treated KO mice compared to untreated wild-type levels. An improved GLA activity was measured in tissues (liver, kidney, and heart) confirming efficient uptake of the enzyme. To increase the gene targeting rate, we performed the nuclease-free approach in the presence of fludarabine, an HR-enhancer drug alongside an independent comparative study with CRISPR/Cas9. Plasma GLA activity was 4-5-fold higher with Fludarabine than donor-only-treated mice. Immunofluorescence analysis showed the absence of Gb3 accumulation in kidneys and Lyso-Gb3 HPLC-Mass spec analysis confirmed a reduction in accumulation. To compare this therapy with available treatments, commercial ERT and AAV-mediated liver gene therapy studies are ongoing.

To test translatability, AAV-LK03 vectors containing hALB homology arms will be tested in tissue culture human liver cell lines, in primary cultures of human hepatocytes, and in humanized mice. This data is inclined toward a promising one-shot therapy using a safer gene-targeting approach to ameliorate FD phenotype.

Terapia per la malattia di Fabry basata nell'editing genetico nel fegato senza l'utilizzo di nucleasi

La malattia di Fabry (FD) è un disordine metabolico legato al cromosoma X, causato da mutazioni genetiche a carico del gene galattosidasi A (GLA). I primi sintomi insorgono precocemente durante l'infanzia (2 anni di vita) e l'adolescenza, e sono caratterizzati dall'accumulo sistemico di glicosfingolipidi nei lisosomi, con una progressiva insufficienza multiorgano, dall'esito in molti casi fatale. I trattamenti disponibili sono la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), che consiste nella somministrazione dell'enzima GLA sintetico (prodotto in laboratorio), e la terapia chaperonica, che stabilizza la conformazione dell'enzima mutante. Queste terapie hanno però diverse limitazioni, tra cui lo sviluppo di anticorpi diretti contro l'enzima artificiale, riducendo notevolmente l'efficacia terapeutica, mentre la terapia chaperonica è efficace solo per particolari mutazioni. Inoltre, sono molto costose, all'incirca €200.000 all'anno per un singolo paziente.

Lo scopo della nostra ricerca è modificare permanentemente il DNA degli epatociti, in modo da produrre alti livelli di enzima che possono entrare nel sangue e raggiungere tutti gli organi, convertendo il fegato in una bio-fabbrica. Gli organi ammalati riceveranno l'enzima circolante come avviene nell'ERT. Per dimostrare l'efficacia del trattamento useremo un modello murino della malattia di Fabry che ricapitola molto bene i sintomi umani. Quest'approccio ha portato a una maggiore attività del GLA plasmatico nei topi Fabry trattati rispetto ai livelli presenti nei topi wild-type non trattati. È stata misurata una migliore attività del GLA nei tessuti (fegato, rene e cuore), e una diminuzione rilevante nell'accumulo dei glicosfingolipidi, a conferma dell'assorbimento efficiente dell'enzima e la sua attività enzimatica.

Testeremo la procedura in culture di epatociti umani e poi in topi chimerici che hanno epatociti umani nel loro fegato. Questi risultati saranno molto importanti per dimostrare la fattibilità della potenziale applicazione dell'approccio nell'uomo. I nostri dati preliminari sono molto incoraggianti e ci aspettiamo che questi dati saranno cruciali per supportare l'uso clinico di quest'approccio, riducendo notevolmente i costi e le limitazioni delle terapie disponibili.

Disease Name:

Fabry Disease

Nome malattia:

Malattia di Fabry

Project number:

GGP20128

185. CELL-BASED ASSAYS OF GLA GENETIC VARIANTS OF UNKNOWN SIGNIFICANCE

Giaquinto L.*, Santoro M., De Matteis M.A.

TIGEM ~ Pozzuoli (NA) ~ Italy

Fabry disease (FD) is a lysosomal storage disorder due to a deficiency of α -galactosidase A (GLA) that results in progressive accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) within lysosomes. The classic FD form is more severe, multisystemic, and appears in childhood. The non-classic or later-onset FD form generally manifests after age 30 and has milder symptoms. The over 1,000 variants of GLA identified are generally classified according to their pathogenicity, although for the group of Variants of Uncertain Significance (VUS) the classification is still very challenging and a matter of debate.

The reasons underlying these uncertainties are manyfold, but two major ones are the limits of the currently used test to measure GLA enzymatic activity, and, of course, the different genetic background that may impinge on “cell-autonomous modifiers” (affecting the ability of a given GLA mutant to act on Gb3) or on “tissue modifiers” (affecting the response of the target tissues). The GLA activity assay is presently performed under artificial conditions, using, at best, leukocyte lysates or plasma and with artificial substrates and does not fully reflect the actual ability of GLA to act on its endogenous substrate in its native environment, the lysosome. With this project we will exploit our knowledge and the molecular and cellular arsenal we have developed over the years to study Gb3 metabolic and cellular flux, to set up assays that can assess in intact cells the ability of the GLA variants to act on Gb3, and to follow the localization and activity of the same GLA variant in cells from patients carrying the same VUS but with different clinical manifestations. The cell-based assays developed thanks to this seed grant, once developed to a higher scale, may integrate the in vitro enzymatic activity assays in the diagnostic toolkit for FD on the one side, and, on the other, may provide hints on cell autonomous modifiers that affect the localization and activity of GLA variants.

Saggi cellulari per valutare l'attività di varianti di significato incerto di GLA

L'enzima α -galattosidasi A (GLA) degrada un grasso noto come Gb3 nel lisosoma (la centrale degradativa delle nostre cellule). Quando GLA è assente o non funziona bene, a causa di mutazioni nel gene GLA, Gb3 non può essere degradato e si accumula nei lisosomi delle cellule creando danni agli organi e ai tessuti. Questa condizione è chiamata malattia di Fabry. La severità della malattia e la gravità dei sintomi dipendono da vari fattori, tra cui il tipo di mutazione. Sono stati identificati più di 1000 tipi di mutazione di GLA. Alla maggior parte di esse è già stata associata la severità dei sintomi, ma per alcune, chiamate Varianti di Significato Incerto (VUS), tale associazione è controversa o sconosciuta e ulteriori studi sono necessari per la loro classificazione. Una delle ragioni di tali controversie si può trovare nel tipo di saggio usato per misurare l'attività dell'enzima GLA che usa condizioni molto artificiali che non riflettono l'effettiva capacità di GLA di agire su Gb3 nel lisosoma. Noi proponiamo di sviluppare saggi cellulari che misurino la capacità delle varianti di GLA di raggiungere la loro sede naturale, il lisosoma, e di agire su Gb3 nel lisosoma. Una volta miniaturizzati e automatizzati questi saggi potrebbero diventare parte dell'armamentario diagnostico per la malattia di Fabry ed il nostro laboratorio, grazie anche al servizio di screening del TIGEM, potrebbe diventare il centro di riferimento per questi saggi per le famiglie italiane.

Disease Name:

Fabry Disease

Nome malattia:

Malattia di Fabry

Project number:

GSA22C022

186. EXPLOITING REGULATORY T-CELL METABOLIC REPROGRAMMING AND VASCULAR TROPISM AS THERAPEUTIC TOOLS FOR FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA

Bonacina F.*, Moregola A., Norata G.D.

Department of Pharmacological and Biomolecular sciences, University of Milan ~ Milan ~ Italy

Familial Hypercholesterolaemia (FH) is a rare genetic disease characterized by elevated plasma cholesterol and premature cardiovascular death. We have previously shown that heterozygous FH subjects and murine models (LDLR-KO mice) present an increased immune-inflammatory response mainly due to a dysfunctional suppressive function of Treg. We tested whether metabolic manipulation of Treg would improve their suppressive function and develop a humanized model of dyslipidemia to study human Treg cellular therapy for FH.

We identify Srebp1c as a key player of the immunometabolic response of Treg. Srebp1c deficiency was associated with a reduced suppressive function in vitro and in vivo in a model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Metabolically, KO Treg showed an impaired lipid metabolism with increased glycolytic potential and accumulation of glycolytic metabolites but with preserved mitochondrial function. RNAseq identified a downregulation of pathways associated to lipid metabolism and tolerogenic response but increased migratory pathways, a phenotype associated to a reduced transcription and activation of Foxp3.

In parallel, we have generated a unique immunodeficient mouse model (Rag2, IL2ry and CD47 KO) crossed with dyslipidemic LDLR-KO mice (TKO-L) that can be engrafted with human hematopoietic cells. TKO mice do not present mature lymphocytes but reduced circulating monocytes and neutrophils compared to WT mice. Dyslipidemic TKO-L mice fed to high cholesterol diet (WTD) develop hypercholesterolemia compared to TKO-L and TKO mice fed to standard diet with increased atherosclerotic plaque and circulating myeloid cells. When hCD34+ were injected after sublethal irradiation of newborns TKO mice, hCD45+ cells were successfully found in the circulation and humanized mice develop hypercholesterolemia.

Manipulation of Treg metabolism coupled to generation of humanized TKO-L would test the efficacy of enhanced immunosuppressive therapy to limit FH progression.

Terapia immunomodulatoria per il trattamento delle malattie cardiovascolari dovute all'ipercolesterolemia familiare

Le malattie cardiovascolari rappresentano ancora oggi la prima causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo, determinando una crescita dei costi socio-economici associati alla loro prevenzione e cura, come riportato da molte società scientifiche (Società Europee di Aterosclerosi e Cardiologia). Accanto allo stile di vita, la predisposizione genetica rappresenta un fattore di rischio determinante delle loro manifestazioni cliniche (infarto), dovute principalmente all'aumento dei livelli plasmatici di lipidi, in particolare di colesterolo, che provocano la formazione di lesioni aterosclerotiche nelle pareti delle arterie. L'ipercolesterolemia familiare (IF) rappresenta una di queste condizioni genetiche, dove alterazioni di geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo (LDLR, ApoB, PCSK9) sono responsabili di ipercolesterolemia ed eventi cardiovascolari precoci.

Le attuali strategie ipocolesterolemizzanti risultano scarsamente efficaci nei soggetti con IF suggerendo la necessità di identificare nuove linee terapeutiche.

Il nostro gruppo ha dimostrato che nei soggetti con IF la malattia cardiovascolare è associata ad una compromissione della risposta immunitaria soppressiva, cioè quella che fa da freno all'iperattivazione immunitaria, risultando in un aumento della risposta infiammatoria che peggiora il processo aterosclerotico.

Scopo del progetto è stato quello di chiarire i meccanismi molecolari responsabili della disfunzione immunitaria riscontrata nei soggetti con IF e validare una terapia immunomodulatoria in modelli animali di IF in cui il sistema immunitario è stato ricostituito con cellule umane.

I dati raccolti hanno permesso di:

- dimostrare che IF causa un'alterazione metabolica nelle cellule immunitarie indipendente dai livelli circolanti di colesterolo;
- identificare regolatori chiave del metabolismo lipidico cellulare come possibili target per ripristinare la corretta funzione cellulare nelle cellule immunitarie dei soggetti con IF;
- generare un modello animale di malattia IF in cui il sistema immunitario viene sostituito con quello umano consentendo così di testare terapie immunomodulatorie in un contesto preclinico della malattia, aprendo così a nuove prospettive di validazione di efficacia e sicurezza di trattamenti innovativi.

Disease Name:

Familial Hypercholesterolemia

Nome malattia:

Ipercolesterolemia familiare

Project number:

GGP19146

187. DUAL TARGET APPROACH FOR THE TREATMENT OF GAUCHER DISEASE: NEW ANTIOXIDANT PH-SENSITIVE PHARMACOLOGICAL CHAPERONES

Davighi M.G.^[1], Tanini D.^[1], Rinaldi M.^[2], Matassini C.^[1], Goti A.^[1], Cardona F.^[1], Morrone A.^[2], Clemente F.*^[1]

^[1]Dipartimento di Chimica 'Ugo Schiff', (DICUS) Università degli studi di Firenze ~ via della Lastruccia 3-13, 50019 Sesto Fiorentino ~ Italy, ^[2]Paediatric Neurology Unit and Laboratories, Neuroscience Department, Meyer Children's Hospital, ~ Viale Pieraccini n. 24, 50139 Firenze ~ Italy

Gaucher disease (GD) is a rare genetic autosomal recessive disorder caused by deficiency of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase) and is associated with wide phenotypic diversity including non-neuronopathic, acute neuronopathic, and chronic neuronopathic forms. Current treatments for GD, including enzyme replacement therapy (ERT) and substrate reduction therapy (SRT), can reverse many of the non-neurological manifestations, but these therapies must be administered continually and are extremely costly. [1] Pharmacological Chaperones Therapy (PCT) is an emerging approach for the treatment of GD. Pharmacological chaperones (PCs) are orally available small molecules able to pass the blood brain barrier and are reversible inhibitors of the enzyme. When they are used in sub-inhibitory amount, they can correct the folding and/or stabilize the enzyme's catalytic activity following the observation of their counter-intuitive effect in enhancing the enzyme activity, thus acting as PCs. [2] The aim of this research is the development and preclinical evaluation on GD cell lines (fibroblasts and neuronal precursor cells) of a novel collection of a small molecules, pH-sensitive N-alkylated trihydroxypiperidines decorated with an antioxidant moiety, as potential multitarget agents for the treatment of GD. These compounds are potential able to a) target enzyme dysfunction modulating the affinity for GCase inside the

lysosomes thanks to pH-sensitive fragment, in order to maximize the PC activity with respect to the inhibitory behaviour [3], b) reduce high oxidative stress observed in GD patients thanks to antioxidant motif and c) address the neuropathic forms of GD. As a further advantage, based on our previous data on analogous compounds, the molecules proposed in this project are expected to have limited toxicity on cell lines, which augurs well for their development as new drugs for GD.

Approccio a “doppio bersaglio” per il trattamento della malattia di Gaucher: nuovi chaperoni farmacologici antiossidanti pH-sensibili

La malattia di Gaucher (GD; Gaucher disease) è una rara malattia genetica autosomica recessiva causata dal deficit dell'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi (GCase) ed è associata ad un'ampia diversità fenotipica tra cui forme non neuropatiche e neuropatiche (acute e croniche). Gli attuali trattamenti per la GD, inclusa la terapia enzimatica sostitutiva (ERT; enzyme replacement therapy) e la terapia di riduzione del substrato (SRT; substrate reduction therapy), possono invertire molte delle manifestazioni non neurologiche, ma queste terapie devono essere somministrate continuamente e sono estremamente costose. [1] La terapia a base di accompagnatori farmacologici (PCT; pharmacological chaperones therapy) è un approccio emergente per il trattamento della GD. Gli accompagnatori farmacologici (PC; pharmacological chaperones) sono piccole molecole, disponibili per via orale, in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica e agire come inibitori reversibili dell'enzima. Quando vengono utilizzati in quantità sub-inibitoria, possono correggere il ripiegamento e/o stabilizzare l'attività catalitica dell'enzima in seguito all'osservazione del loro effetto controintuitivo nel potenziare l'attività enzimatica, agendo quindi come PC. [2] Lo scopo di questa ricerca è lo sviluppo e la valutazione preclinica su linee cellulari di GD (fibroblasti e cellule precursori neuronali) di una nuova collezione di piccole molecole, triidrossipiperidine N-alcilate pH-sensibili portanti un frammento antiossidante, come potenziali agenti a “doppio bersaglio” per il trattamento della GD. Questi composti sono potenzialmente in grado di a) bersagliare la disfunzione enzimatica modulando l'affinità per GCase all'interno dei lisosomi grazie al frammento sensibile al pH, al fine di massimizzare l'attività del PC rispetto al comportamento inibitorio [3], b) ridurre l'elevato stress ossidativo osservato nei pazienti con GD grazie al frammento antiossidante e c) affrontare le forme neuropatiche di GD. Come ulteriore vantaggio, sulla base dei nostri dati precedenti su composti analoghi, ci si aspetta che le molecole proposte in questo progetto abbiano una tossicità limitata sulle linee cellulari, il che è di buon auspicio per il loro sviluppo come nuovi farmaci per la GD.

Disease Name:

Gaucher Disease

Nome malattia:

Malattia di Gaucher

Project number:

GSA22P001

188. FREE CYTOSOLIC-MITOCHONDRIAL DNA TRIGGERS A POTENT TYPE-I INTERFERON RESPONSE IN KEARNS-SAYRE PATIENTS COUNTERACTED BY MOFETIL MYCOPHENOLATE

Di Nottia M.^[1], Caiello I.^[2], De Benedetti F.^[2], Dionisi-Vici C.^[3], Bertini E.^[1], Carrozzo R.^[1], Martinelli D.*^[3]

^[1]Unit of Muscular and Neurodegenerative Disorders, Laboratory of Molecular Medicine, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS ~ Roma ~ Italy, ^[2]Division of Rheumatology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS ~ Roma ~ Italy,

^[3]Division of Metabolism, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS ~ Roma ~ Italy

Introduction

Defects in mitochondrial DNA (mtDNA) replication are the genetic cause of a subgroup of mitochondrial diseases (MDs), characterized by mtDNA depletion/deletions. MtDNA instability could compromise mitochondrial functioning, thus affecting cellular health.

Mitochondria, in addition to play a role in energy production, are also involved in innate immunity processes. Upon mitochondrial damage, intra-mitochondrial components, including mtDNA, can be released into the cytoplasm, eliciting innate immune responses. Cytosolic mtDNA can function as endogenous ligand for the cytosolic DNA sensor cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase (cGAS) which triggers a potent IFN response. A link between cytosolic leakage of mtDNA and inflammatory responses has been described in some neurological disorders and, recently, also in MDs characterized by mtDNA instability. However, the role of inflammatory process in MDs, and its relevance for causing different manifestations of tissue-specific defects remain unknown.

Results

In our hospital, in ten patients with Kearns-Sayre syndrome (KSS) we have been observed clinical manifestations resembling type I Interferonopathies. Following these observations, we investigated inflammatory biomarkers in peripheral blood and in primary fibroblasts from the same patients. We observed increased levels of type I Interferon (IFN I)-related chemokines and a significant increase of type I IFN score. Moreover, in two patient fibroblasts from 2 patients with high mtDNA deletion amount, the mtDNA-specific PCR of the mitochondria-free cytosolic fraction documented a significant increase of cytosolic mtDNA. In the same patients we observed increased expression of the gene coding for STING protein, suggesting the involvement of this protein in the IFN response observed in our patients. The treatment of KSS fibroblasts with mycophenolate-mofetil, an immunosuppressant widely used in several type I Interferonopathies, produced a significant decrease of the inflammatory mediators.

Conclusion

In conclusion, our results highlight that KSS may be considered a secondary interferonopathy and suggest the importance to study and counteract the inflammatory response in these disorders. The identification of biomarkers related to IFN signaling, a new finding for primary MDs, could accelerate the development of new therapeutic protocols, considering that therapies targeting IFN signaling are already available for type I interferonopathies.

Il rilascio di DNA mitocondriale nel citosol innesca nei pazienti con Sindrome di Kearns-Sayre una risposta cellulare mediata dall' interferone di tipo I, che può essere contrastata dal micofenolato mofetil.

Introduzione

I difetti nella replicazione del DNA mitocondriale (mtDNA) sono la causa genetica di un sottogruppo di malattie mitocondriali caratterizzate da deplezione o delezioni del DNA mitocondriale. L'instabilità del MtDNA potrebbe compromettere il funzionamento mitocondriale, influenzando così la salute cellulare.

I mitocondri, oltre a svolgere un ruolo nella produzione di energia, sono anche coinvolti nei processi di immunità innata. In caso di danno mitocondriale, il mtDNA, può essere rilasciati nel citoplasma, attivando risposte immunitarie innate. Il mtDNA citosolico può funzionare come ligando endogeno per il sensore del DNA citosolico guanosina monofosfato-adenosina monofosfato sintasi ciclico (cGAS) che innesca una potente risposta IFN. Un legame tra perdita citosolica di mtDNA e risposte infiammatorie è stato descritto in alcuni disturbi neurologici e, recentemente, anche in MD caratterizzati da instabilità del mtDNA. Tuttavia, il ruolo della infiammazione nella genesi di diverse manifestazioni tessuto-specifiche nelle malattia mitocondriale rimane sconosciuto.

Risultati

Nel nostro ospedale, in dieci pazienti con sindrome di Kearns-Sayre (KSS) sono state osservate

manifestazioni cliniche simili alle interferonopatie di tipo I. A seguito di queste osservazioni, abbiamo studiato i biomarcatori infiammatori nel sangue periferico e nei fibroblasti dei pazienti. Abbiamo pertanto osservato un aumento dei livelli di chemochine correlate all'interferone di tipo I (IFN I) e un aumento significativo del punteggio dell'IFN I. Inoltre, in fibroblasti di due pazienti con un'elevata quantità di delezione del mtDNA è stato osservato un aumento significativo del mtDNA citosolico. Negli stessi pazienti abbiamo osservato una maggiore espressione del gene che codifica per la proteina STING, suggerendo il coinvolgimento di questa proteina nella risposta interferonica osservata nei nostri pazienti. Il trattamento dei fibroblasti KSS con micofenolato-mofetile, un immunosoppressore ampiamente utilizzato in diverse interferonopatie di tipo I, ha prodotto una significativa diminuzione dei mediatori infiammatori.

Conclusione

I nostri risultati evidenziano che la KSS può essere considerata un'interferonopatia secondaria e suggeriscono l'importanza di studiare e contrastare la risposta infiammatoria in questi disturbi. L'identificazione in vivo e in vitro di biomarcatori correlati alla risposta mediata dall'interferone, una nuova scoperta per le malattie mitocondriali primarie, potrebbe accelerare lo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici, considerando che terapie mirate in grado di modulare la risposta interferonica sono già disponibili per le interferonopatie di tipo I.

Disease Name:

Kearns-Sayre Syndrome

Nome malattia:

Sindrome di Kearns-Sayre

Project number:

GGP20134

189. EVALUATING THE EFFICACY OF A GENE EDITING STRATEGY FOR PROGRESSIVE FAMILIAR INTRAHEPATIC CHOLESTASIS TYPE 2 (PFIC-2)

Simoni C.*^[1], Barbon E.^[1], Starinieri F.^[1], Cappelluti M.A.^[1], Negri C.^[1], Biffi M.^[1], Sanvito F.^[2], Lombardo A.^[1], Cantore A.^[1]

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy ~ Milano ~ Italy, ^[2]IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy

Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC-2) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in ABCB11 gene encoding the hepatocyte bile salt transporter. Consequently, secretion of bile is impaired, causing jaundice, pruritus, fibrosis and leading to liver failure. Most patients ultimately undergo liver transplantation as only curative option. Liver directed in vivo genome editing would potentially allow for a stable gene correction in PFIC-2 paediatric patients, thus preventing liver toxicity. Here we aim to evaluate the efficiency of a CRISPR-Cas9 platform for integrating the ABCB11 cDNA under the control of its endogenous promoter, by delivering the donor DNA in vivo with viral vectors. Since PFIC-2 patients present liver fibrosis early in life, it is essential to assess its impact on viral vector mediated hepatocyte transduction. We designed guide RNAs (gRNA) targeting the first intron of ABCB11 to address all described mutations and maintain as much as possible physiologic gene expression. We screened 12 guide RNAs for cutting efficiency in hepatocyte cell lines and selected the best performing ones. We then tested different integration strategies based on homology directed repair (HDR), micro-homology mediated end-joining and homology-independent targeted integration. We observed that the most efficient integration was obtained with HDR-based donor DNAs in this setting. To assess the impact of fibrosis on transduction, we intravenously administered lentiviral vector (LV) encoding for

a reporter gene to CCl₄ treated mice, displaying severe pericentral fibrosis. In this model we observed a reduced LV transduction. The same experiment was performed in 6-month-old PFIC-2 mice, a model of mild periportal fibrosis, showing a slight reduction of LV transduction. Overall, these data provide the basis to further develop in vivo genome editing and to assess the best therapeutic window for the treatment of PFIC-2 patients.

La colestasi intraepatica familiare progressiva di tipo 2 (PFIC-2) è una malattia metabolica autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene ABCB11, che codifica per il trasportatore dei sali biliari espresso sulla membrana cellulare degli epatociti. Di conseguenza, la secrezione di bile da parte del fegato è compromessa. Ciò causa ittero, prurito, fibrosi e può portare all'insufficienza epatica. La maggior parte dei pazienti viene sottoposta a trapianto di fegato quale unico trattamento curativo. L'editing del genoma degli epatociti permetterebbe potenzialmente una correzione stabile della patologia nei pazienti pediatrici con PFIC-2, prevenendo così lo sviluppo della malattia e la conseguente tossicità epatica. In questo progetto intendiamo valutare l'efficacia di una strategia di editing genomico basata sull'utilizzo di CRISPR-Cas9. L'enzima Cas9, guidato da un RNA guida (gRNA), è in grado di tagliare il DNA in un punto preciso. Se a questo sistema si aggiunge un DNA donatore è possibile inserire una sequenza desiderata nel sito di taglio. Il nostro obiettivo è quindi inserire una sequenza di DNA codificante per ABCB11 sotto il controllo del promotore endogeno del gene, sfruttando vettori virali per far arrivare il DNA donatore agli epatociti. Poiché i pazienti PFIC-2 sviluppano fibrosi epatica in età pediatrica, è essenziale valutare l'impatto della fibrosi sul trasferimento genico agli epatociti mediato da vettori virali. Abbiamo disegnato diversi gRNA che avessero come bersaglio il primo introne di ABCB11 per correggere tutte le mutazioni descritte e mantenere il più possibile l'espressione genica fisiologica. Abbiamo testato 12 gRNA in linee cellulari confrontando l'efficienza di taglio e selezionando quelli con le migliori prestazioni. Abbiamo poi testato alcune strategie di integrazione per il DNA donatore basate su diversi meccanismi: la riparazione per ricombinazione (HDR), la saldatura delle estremità mediata da micro-omologie e la saldatura delle estremità non omologhe. L'integrazione più efficiente è stata ottenuta con DNA donatori basati sul meccanismo di HDR. Per valutare l'impatto della fibrosi sul trasferimento genico abbiamo sfruttato un modello murino di fibrosi indotta chimicamente tramite CCl₄, che presenta una fibrosi epatica pericentrale grave. Abbiamo somministrato a questi topi un vettore lentivirale (VL) codificante per un gene reporter. In questo modello abbiamo osservato una riduzione del trasferimento genico mediato da VL, osservando una diminuzione dell'espressione del transgene. Lo stesso esperimento è stato eseguito in topi PFIC-2 di 6 mesi, un modello di fibrosi epatica periportale lieve. In questo modello abbiamo osservato una modesta riduzione dell'espressione del transgene veicolato tramite VL. Nel complesso, questi dati forniscono informazioni importanti per lo sviluppo della strategia di editing genomico di ABCB11 e per stabilire la migliore finestra terapeutica per il trattamento dei pazienti PFIC-2.

Disease Name:

Progressive familiar intrahepatic cholestasis

Nome malattia:

Colestasi intraepatica familiare progressiva di tipo 2

Project number:

TGT22C04

190. MICE LACKING TRPML1 PRESENT KIDNEY DISEASE

Giuseppina G.*, Sandro M., Diego M.

TIGEM ~ Napoli ~ Italy

TRPML1 (Transient Receptor Potential cation channel, Mucolipin subfamily 1) is a non-selective cation channel that localizes on the lysosomal membrane and is the principal calcium-release channel in this compartment. TRPML1 activity is involved in many membranes trafficking processes such as lysosome to TGN (Trans-Golgi-Network) retrograde trafficking, autophagosome (AV)-lysosome fusion, lysosome reformation, and lysosomal exocytosis. Mutations in TRPML1 cause Mucopolipidosis type IV (MLIV: OMIM 252650), a rare autosomal recessive LSD (lysosomal Storage Disease) characterized by severe intellectual disability, speech deficit, progressive visual impairment leading to blindness, myopathy, and achlorhydria. Recently, some reports described kidney disease and kidney failure in various MLIV patients in the second to the third decade of life. However, the physiological role of TRPML1 in the kidney and the molecular mechanisms involved in kidney defects in MLIV are still unknown. Here we study the role of TRPML1 in kidney function by using in vitro and in vivo models of MLIV.

Histological characterization of kidneys from MLIV mice resulted in the identification of alterations of Proximal Tubular Cells (PTCs) at the level of the Brush Border (BB). Thus, we found a reduction of Periodic Acid of Schiff (PAS) staining and a less-developed BB compared with the preserved apical pole of PTCs from WT mice. Also, the BB marker Ezrin, a protein that plays a structural and regulatory role by stabilizing specialized plasma membrane domains, was delocalized in the cytoplasm compared with the subapical pole localization observed in the BB of WT PTCs. Functionally, we found; a progressive alteration of apical endocytosis characterized by the mislocalization of megalin, a receptor of the Apical-Receptor Mediated Endocytosis (ARME) complex; an impaired fusion of early endosomes; impaired apical recycling; and the swelling of late endosomes/lysosomes. Using proteomics analysis of MLIV mouse urine, we found aberrant excretion of low-weight proteins such as vitamin D-binding protein, Apo-E, and gelsolin. Indeed, immunoblot analysis of MLIV mouse urine confirmed the proteinuria and enzymuria and identified the excretion of albumin, transferrin, retinol-binding protein, and the lysosomal enzymes hexosaminidase, and cathepsins.

Together, our data unveiled a new role of the lysosomal calcium channel TRPML1 in renal function through the modulation of ARME. Most importantly, our observations mechanistically explain kidney disease in MLIV patients and set the bases for developing novel therapeutics to ameliorate kidney phenotype.

ASSENZA DI TRPML1 CAUSA PROBLEMI RENALI IN MODELLO MURINO.

TRPML1 (Transient Receptor Potential cation channel, Mucolipin subfamily 1) è un canale cationico non selettivo che si localizza sulla membrana del lisosoma ed è il principale canale di rilascio del calcio in questo compartimento. All'interno della cellula l'attività di TRPML1 è coinvolta in molti processi di traffico di membrana. Mutazioni in TRPML1 causano la Mucopolipidosi di tipo IV (MLIV: OMIM 252650), una rara malattia da accumulo lisosomiale, malattia autosomica recessiva caratterizzata da grave disabilità intellettiva, deficit del linguaggio, progressiva riduzione della vista fino alla cecità, miopatia e acloridria. Recentemente, alcuni rapporti hanno descritto malattie renali e insufficienza renale in vari pazienti affetti da MLIV nella seconda o terza decade di vita. Tuttavia, il ruolo fisiologico di TRPML1 nel rene e i meccanismi molecolari coinvolti nei difetti renali nella MLIV sono ancora sconosciuti. Qui studiamo il ruolo di TRPML1 nella funzione renale utilizzando modelli in vitro e in vivo di MLIV.

La caratterizzazione istologica dei reni di topi MLIV ha portato all'identificazione di alterazioni delle

cellule tubulari prossimali (PTCs) a livello della villosità apicale (Brush Border, BB). Abbiamo così riscontrato una riduzione della colorazione con Acido Periodico di Schiff (PAS) e un BB meno sviluppato rispetto al polo apicale conservato delle PTC dei topi controllo. Inoltre, il marcatore della BB, Ezrin, una proteina che svolge un ruolo strutturale e regolatorio stabilizzando domini specializzati della membrana plasmatica, era delocalizzato nel citoplasma rispetto alla localizzazione al polo subapicale osservata nella BB delle PTC controllo. Dal punto di vista funzionale, abbiamo riscontrato una progressiva alterazione dell'endocitosi apicale, caratterizzata da un'errata localizzazione della megalina, un recettore del complesso Endocitosi Apicale Mediata da Recettori (ARME), un'alterata fusione degli endosomi precoci, un alterato riciclo apicale e un rigonfiamento degli endosomi tardivi/lisosomi. Utilizzando l'analisi proteomica delle urine di topi MLIV, abbiamo riscontrato un'escrezione aberrante di proteine a basso peso, come la proteina legante la vitamina D, l'Apo-E e la gelsolina. In effetti, l'analisi immunoblot delle urine di topi MLIV ha confermato la proteinuria e l'enzimuria e ha identificato l'escrezione di albumina, transferrina, proteina legante il retinolo ed enzimi lisosomiali esosaminidasi e catepsine. Insieme, i nostri dati hanno svelato un nuovo ruolo del canale del calcio lisosomiale TRPML1 nella funzione renale attraverso la modulazione dell'ARME. Soprattutto, le nostre osservazioni spiegano meccanicamente la malattia renale nei pazienti affetti da MLIV e pongono le basi per lo sviluppo di nuove terapie per migliorare il fenotipo renale.

Disease Name:

Mucopolipidosis type IV

Nome malattia:

Mucopolipidosi tipo 4

Project number:

TGM22CBDM04

191. BONE DEFECTS AND CROSS-CORRECTION IN MPSIH HSPC-GT

Santi L.*^[1], Crippa S.^[1], Capo V.^[1], Penna S.^[1], De Ponti G.^[1], Alberti G.^[1], Berti M.^[1], Consiglieri G.^[2], Tucci F.^[2], Riminucci M.^[3], Corsi A.^[3], Barbero A.^[4], Lopa S.^[5], Martin I.^[4], Moretti M.^[5], Gentner B.^[1], Aiuti A.^[1], Villa A.^[1], Bernardo M.E.^[1]

^[1]SR-TIGET ~ Milan ~ Italy, ^[2]Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit ~ Milan ~ Italy, ^[3]Department of Molecular Medicine Sapienza University ~ Rome ~ Italy, ^[4]Tissue Engineering Department of Biomedicine ~ Basel ~ Switzerland, ^[5]Cell and Tissue Engineering Laboratory, Galeazzi ~ Milan ~ Italy

Mucopolysaccharidosis type I Hurler (MPSIH) patients show progressive accumulation of GAGs, leading to multi-organ dysfunction and skeletal abnormalities, that remain uncorrected by allogeneic stem cell transplantation. Results of the Phase I/II ex vivo gene therapy (GT) clinical trial (NCT03488394) in 8 patients have shown potential metabolic and skeletal correction.

Osteomedullary biopsies (BOMs) of MPSIH patients displayed a reduced expression of type I collagen and a morphological disorganization of chondrocytes (CHs). To further investigate this aspect, an in vitro 3D model of hypertrophic cartilage will evaluate whether patient-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) are able to generate de novo bone tissue.

In vitro characterization of patient-derived osteoclasts (OCs) and MSCs, before and after GT, was not impaired by IDUA deficiency. Although MPSIH-MSCs normally underwent intramembranous ossification, osteoblasts (OBs) showed intracellular GAGs accumulation. Patient-derived gene corrected OCs, expressing supraphysiologic enzyme levels, could cross-correct non-hematopoietic cells in the bone environment by releasing the enzyme. Due to the ability of MPSIH OBs to uptake the IDUA enzyme when exposed to the supernatant of patient gene-corrected osteoclasts, GAG

accumulation found in MPSIH-OBs was rescued, demonstrating the feasibility of the cross-correction.

Moreover, MPSIH BOMs before GT showed enthesopathy that was completely reversed after GT. To better characterize this feature, the Achilles tendons of untreated MPSI mice at different ages were harvested showing a progressive vacuolization, matrix mineralization and calcification. In addition, a reduced number of OBs but an increased bone formation rate were found in long bones of MPSI mice. These musculoskeletal features will be further investigated in GT-treated patients and mice to provide a broader understanding of disease-specific pathogenetic mechanisms and bone cross-correction after GT.

Terapia genica per la correzione dei difetti scheletrici nei pazienti affetti da Mucopolisaccaridosi di tipo 1.

I pazienti affetti da mucopolisaccaridosi di tipo I Hurler (MPSIH) presentano un progressivo accumulo di GAG, che porta a disfunzioni multiorgano e anomalie scheletriche, che non vengono corrette dal trapianto di cellule staminali. I risultati dello studio clinico di fase I/II di terapia genica ex vivo (GT) (NCT03488394) in 8 pazienti hanno mostrato una potenziale correzione metabolica e scheletrica.

Le biopsie osteomidollari dei pazienti affetti mostrano una ridotta espressione di collagene e una disorganizzazione morfologica dei condrociti (CH). Per approfondire questo aspetto, un modello 3D in vitro di cartilagine ipertrofica valuterà se le cellule stromali mesenchimali (MSC) derivate dal paziente sono in grado di generare tessuto osseo.

Inoltre, le biopsie osteomidollari dei pazienti prima della GT mostrano entesopatia che viene corretta dopo la GT. Per caratterizzare meglio questo fenomeno, abbiamo analizzato i tendini di Achille di topi MPSI e abbiamo osservato una progressiva vacuolizzazione, mineralizzazione della matrice e calcificazione. Inoltre, nelle ossa lunghe dei topi MPSI è stato riscontrato un numero ridotto di OB ma un aumento del tasso di formazione ossea. Queste caratteristiche muscoloscheletriche saranno ulteriormente studiate nei pazienti e nei topi trattati con GT per fornire una più ampia comprensione dei meccanismi patogenetici specifici della malattia e della correzione ossea dopo GT.

Disease Name:

Mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome)

Nome malattia:

Mucopolisaccaridosi di tipo 1 (Sindrome di Hurler)

Project number:

TGT22C01; TGT22C02

192. AMYLOID AGGREGATION AND LYSOSOMAL MEMBRANE DYNAMICS IN SANFILIPPO DISEASE

Monaco A.^[1], Galiano L.^[1], Giaccio M.^[1], Rubino R.^[1], Fusco G.^[2], De Simone A.^[2], Fraldi A.^[1]

^[1]CEINGE Biotechnologie Avanzate ~ Napoli ~ Italy, ^[2]University of Naples Federico II ~ Napoli ~ Italy

Sanfilippo syndrome is an inherited lysosomal disease associated to defective autophagy-lysosomal pathway (ALP). Neuropathy is a predominant feature of Sanfilippo patients, however, to date, it is still incurable.

Recently, we found that Sanfilippo disease is characterized by a progressive aggregation of amyloid proteins (mostly α -synuclein), which affect ALP, thus generating a neurotoxic vicious cycle.

Nevertheless, the mechanisms by which amyloid aggregation causes ALP dysfunction remain partially elucidated.

By using Sanfilippo mouse brain samples and primary neuronal cultures, we have demonstrated that amyloid proteins accumulate in the proximity of lysosomes, where they cause massive lysosomal enlargement and perinuclear clustering. This, in turns, impairs the lysosomal capability to encounter and clear autophagosomes to complete autophagy. Nuclear magnetic resonance data and experiments in a cell-free system, showed that such effect is mediated by the direct binding of α -synuclein to the lysosomal membrane that induce the assembly and fusion of lysosomes in large structures through the ability of α -synuclein to form a "double-anchor" between lysosomes and to self-aggregate. It is known that lysosomal size and dynamics is functionally associated to the Endoplasmic Reticulum (ER) membrane organization and, specifically, to the ER-lysosome contact sites. Therefore, we hypothesize that the amyloid-mediated increase in the lysosomal size may alter ER-lysosome contact sites, thus reducing lysosomal dynamics and availability for proper neuronal function, including autophagy.

Our results uncover a new mode of action by which amyloid deposition affect lysosomal function, thus identifying alternative druggable mechanisms, which may be relevant not only for the treatment of Sanfilippo disease but also for other neurodegenerative conditions associated to amyloid aggregation and ALP dysfunction.

Aggregazione amiloide e dinamiche della membrana lisosomiale nella sindrome di Sanfilippo

La sindrome di Sanfilippo è una malattia lisosomiale ereditaria associata a difetti nel circuito autofagico-lisosomiale (ALP). La neuropatia è una caratteristica predominante dei pazienti affetti dalla Sanfilippo, tuttavia, ad oggi, è ancora incurabile. Recentemente, abbiamo scoperto che la malattia di Sanfilippo è caratterizzata da una progressiva aggregazione di proteine amiloidi (principalmente α -sinucleina) che influenzano l'ALP, generando così un circolo vizioso neurotossico. Tuttavia, i meccanismi mediante i quali l'aggregazione amiloide causa la disfunzione dell'ALP rimangono parzialmente chiariti. Utilizzando campioni di cervello di topo Sanfilippo e colture neuronali primarie, abbiamo dimostrato che le proteine amiloidi si accumulano in prossimità dei lisosomi, dove provocano un massiccio ingrandimento del comparto lisosomiale con raggruppamento di questi nella zona perinucleare. Questo, a sua volta, compromette la capacità lisosomiale di incontrare e metabolizzare gli autofagosomi in modo da completare l'autofagia. Dati di risonanza magnetica nucleare ed esperimenti in sistemi "cell-free" hanno mostrato che tale effetto è mediato dal legame diretto dell' α -sinucleina alla membrana lisosomiale che induce l'assemblaggio e la fusione dei lisosomi in grandi strutture attraverso la capacità della α -sinucleina di autoaggregarsi e di formare una "doppia ancora" tra i lisosomi. È noto che la dimensione e la dinamica dei lisosomi è funzionalmente associata all'organizzazione della membrana del reticolo endoplasmatico (ER) e, in particolare, ai siti di contatto ER-lisosomi. Pertanto, ipotizziamo che l'aumento mediato dall'amiloide nella dimensione dei lisosomi può alterare i siti di contatto tra le membrane dell'ER e dei lisosomi, riducendo così la dinamica e la disponibilità lisosomiale, fondamentali per una corretta funzione neuronale, inclusa l'autofagia.

I nostri risultati scoprono un nuovo meccanismo mediante il quale la deposizione di proteine amiloidi influenza la funzione lisosomiale, identificando quindi altri meccanismi modulabili mediante trattamenti farmacologici, che possono essere rilevanti non solo per il trattamento della malattia di Sanfilippo ma anche per altre condizioni neurodegenerative associate all'aggregazione amiloide e alla disfunzione dell'ALP.

Disease Name:

Mucopolysaccharidosis type III

Nome malattia:

Mucopolisaccaridosi di tipo III

Project number:

GMR22T1082

193. PHARMACOLOGICAL STIMULATION OF AUTOPHAGY TO RESCUE PROTEINOPATHY AND COGNITIVE DECLINE IN MUCOPOLYSACCHARIDOSIS-III

Somma C.*, Monaco M., Capuozzo A., Medina D.L., De Risi M., De Leonibus E.

Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli ~ Italy

Mucopolysaccharidosis IIIA (MPS-III A) is a lysosomal storage disorder (LSD) characterized by the loss of function of the sulfamidase gene (SGSH), responsible for the degradation of the glycosaminoglycan (GAG) heparan sulfate (HS). Undegraded HS leads to the formation of primary and secondary storages responsible for neurodegeneration and dementia in children. Favours the degradation of secondary storages is one of the most promising therapeutic strategies to prevent neurodegeneration. Genetic overexpression of the transcription factor EB (TFEB), through the control of genes involved in the autophagy/lysosomal degradation process, seems to promote the degradation of protein aggregates in animal models of neurodegeneration. However, there are still few synthetic drugs capable to stimulate TFEB and to cross the blood-brain barrier. We are testing a compound that in wild-type/control animal models has been shown to promote TFEB-mediated autophagy and lysosomal biogenesis.

In this project, using validated animal and cellular models of MPS-III A, we have tested it in in vitro and in vivo models of MPS-III A. The in vitro analysis elucidated the mechanism by which the drug activates TFEB in the context of the disease, while the in vivo analysis shed light on its ability to improve some of the cognitive deficits associated with the accumulation of undegraded HS in the brain of MPS-III A animals, without any major side effect. In addition, the ex-vivo analysis revealed the ability of the drug to clear secondary storages made of beta-amyloid. These results suggest a new therapeutic approach for the treatment of MPS-III A.

La stimolazione farmacologica dell'autofagia come trattamento della neurodegenerazione nella Mucopolisaccaridosi di tipo IIIA

La mucopolisaccaridosi di tipo IIIA (MPS-III A) è una malattia da accumulo lisosomiale (LSD) caratterizzata dalla perdita di funzione del gene della sulfamidasi (SGSH), responsabile della degradazione del glicosaminoglicano (GAG) eparan solfato (HS). L'HS non degradato porta alla formazione di depositi primari e secondari responsabili della neurodegenerazione e della demenza in età pediatrica. Favorire la degradazione degli accumuli secondari è una delle strategie terapeutiche più promettenti per prevenire la neurodegenerazione. L'overespressione genetica del fattore di trascrizione EB (TFEB), attraverso il controllo di geni coinvolti nel processo autofagico-lisosomiale, sembra promuovere la degradazione degli aggregati proteici in modelli animali di neurodegenerazione. Tuttavia, sono ancora pochi i farmaci in grado di stimolare TFEB e di attraversare la barriera emato-encefalica. Attualmente, stiamo testando un composto che è in grado di promuovere l'autofagia mediata da TFEB e la biogenesi lisosomiale in modelli animali di controllo.

In questo progetto, utilizzando modelli animali e cellulari di MPS-III A convalidati, abbiamo testato il composto in modelli in vitro e in vivo di MPS-III A. L'analisi in vitro ha chiarito il meccanismo con cui il farmaco attiva TFEB nel contesto della malattia, mentre l'analisi in vivo messo in luce la sua capacità di migliorare alcuni dei deficit cognitivi associati all'accumulo di HS non degradato nel cervello degli animali affetti da MPS-III A, senza alcun effetto collaterale di rilievo. Inoltre, l'analisi ex-vivo ha rivelato la capacità del farmaco di eliminare gli accumuli secondari di beta-amiloide. Questi risultati suggeriscono un nuovo approccio terapeutico per il trattamento della MPS-III A.

Disease Name:

Mucopolysaccharidosis type III A

Nome malattia:

Mucopolisaccaridosi di tipo IIIA

Project number:

GSA21D013

194. EARLY DEVELOPMENT OF MPS-IIIA DOPAMINERGIC NEURONS: AT THE NEXUS OF BEHAVIOR CHANGES AND THERAPY

Cusimano L.*^[1], De Risi M.^[1], Bujanda Cundin X.^[1], Pizzo M.^[1], Fecarotta S.^[2], Parenti G.^[1], De Leonibus E.^[1]

^[1] Telethon Institute of Genetics and Medicine, Telethon Foundation, Pozzuoli, Italy ~ Napoli ~ Italy, ^[2]3 Department of Pediatrics "Federico II" University Hospital, Naples, Italy ~ Napoli ~ Italy

Mucopolysaccharidosis III-A (MPS-IIIA) is a neurodegenerative lysosomal storage disorder (LSD) caused by deficiency of enzyme sulfamidase (SGSH). As a consequence, the heparan sulfate (HS) accumulates inside cells, finally leading to neuronal death. The pathology early manifests with autism-like behavioural symptoms (ALBs), including self-injury, stereotypic behaviours, social behaviour dysfunctions and then show dementia and motor impairment at a pediatric age. ALBs in MPS-IIIA have a dramatic impact on children and parents' life and are resistant to behavioural and antipsychotic therapies. We have studied early brain development in MPS-IIIA mice, which has revealed altered heparan sulfate function rather than lysosomal storage per se results in a developmental overgrowth of dopamine producing neurons. We have found that these changes are associated with autistic-like behaviors, which provides both insights on the pathobiology and suggests a potential approach to therapy involving a dopamine D1-like receptor antagonist, designated SCH-23390. We are testing in clinical settings an already FDA approved dopaminergic drug that might act, though a different biochemical pathway, on the same dysfunctional mechanism responsible for autistic-like behaviors in MPS-IIIA.

Alterazioni del neurosviluppo nella malattia di Sanfilippo: dal laboratorio alla clinica

La mucopolisaccaridosi-IIIA (MPS-IIIA) è una malattia neurodegenerativa appartenente al gruppo delle malattie da accumulo lisosomiale causata da mutazioni a carico del gene codificante per l'enzima sulfamidasi che ne riducono la funzione. Di conseguenza, l'eparan solfato (HS) si accumula all'interno delle cellule, portando infine alla morte neuronale. La patologia si manifesta precocemente con sintomi comportamentali simili all'autismo (ALBs), tra cui autolesionismo, comportamenti stereotipati ed alterazioni dei comportamenti sociali, che poi evolvono in demenza e perdita delle abilità motorie in età pediatrica. Gli ALBs nella MPS-IIIA hanno un impatto drammatico sulla vita dei bambini e dei genitori e sono resistenti alle terapie comportamentali e antipsicotiche. Studiando lo sviluppo cerebrale in modelli murini di MPS-IIIA abbiamo rilevato un'alterazione della funzione dell'eparan solfato piuttosto che un accumulo lisosomiale di per sé, che determina una proliferazione eccessiva dei neuroni dopaminergici di origine mesencefalica. Abbiamo scoperto che queste alterazioni sono associate ai comportamenti di tipo autistico, il che fornisce approfondimenti sulla patobiologia e suggerisce un potenziale approccio terapeutico che prevede l'uso di un antagonista del recettore D1 della dopamina, denominato SCH-23390. Stiamo testando in ambito clinico un farmaco dopaminergico già approvato dalla FDA che potrebbe agire, attraverso una diversa via biochimica, sullo stesso meccanismo alterato responsabile dei comportamenti autistici nella MPS-IIIA.

Disease Name:

Mucopolysaccharidosis type III A

Nome malattia:

Mucopolisaccaridosi di tipo IIIA

Project number:

TGM22MT07

195. GENERATION, SELECTION AND CHARACTERISATION OF A NOVEL MOUSE MODEL FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE IVA

Berti M.*^[1], Crippa S.^[1], Jofra--Hernandez R.^[1], Santi L.^[1], De Ponti G.^[1], Alberti G.^[1], Mancino M.^[1], Basini T.^[1], Scala S.^[1], Quaranta P.^[1], Basso--Ricci L.^[1], Visigalli I.^[2], Zambimini G.^[2], Norata R.^[3], Rocchi M.^[3], Sanvito F.^[3], Bolamperti S.^[4], D"Adamo P.^[5], Spinelli A.^[6], Aiuti A.^[1], Bernardo M.E.^[1]

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[2]SR-TIGET Good Laboratory Practice (GLP) Test Facility ~ Milan ~ Italy, ^[3]Pathology Unit, Department of Experimental Oncology, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[4]Osteoporosis and bone and mineral metabolism Unit, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[5]Mouse Behavior Facility, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[6]Preclinical imaging Facility, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Mucopolysaccharidosis type IVA (MPSIVA) is a lysosomal storage disease caused by mutations in the GALNS gene with consequent deficiency of N-acetylgalactosamine-6-sulphate sulphatase (GALNS) enzyme. As a result, progressive accumulation of Keratan Sulphate (KS) and Chondroitin-6-Sulphate (C6S) is observed in tissues, clinically translating in severe skeletal phenotypes and growth delay. Vimizin, an enzyme-replacement therapy, is the only registered treatment against MPSIVA, though not curative. An ex-vivo gene therapy (GT) approach could offer a definitive therapeutic option for MPSIVA patients; however, available murine models are not representative of the human disease, making therapy development challenging. Thus, we propose to establish and characterise a new MPSIVA mouse model. In C57Bl/6J mice, we generated a mutation in the GALNS locus by CRISPR-Cas9, obtaining five different variants. Galns-/- (knockouts, KOs) for each mutation are being evaluated using biochemical (enzymatic activity, KS accumulation), morphological (length measurement, weight gain, CT-scan), behavioural (rotarod, grip and footprint tests) and histopathological parameters to select the most representative model. Additionally, we have investigated the models' systemic and organ-associated inflammation. Biochemical analyses have confirmed all KOs to have no GALNS activity, whilst KS accumulation has been detected in the peripheral blood of two of our KO variants. However, only one out of four maintained lower weight gain over time and shorter long bones, suggesting a skeletal involvement. In line with these results, the same KO variant showed differences in bone resistance and cortical composition and performed worst in the behavioural tests. Overall, these results will lead to select the most representative MPSIVA mouse model for further of a novel lentiviral-based ex-vivo GT, while highlighting cellular and molecular mechanisms behind MPSIVA progression.

Sviluppo e descrizione di un nuovo modello di topo per la Mucopolisaccaridosi di tipo IVA

La Mucopolisaccaridosi di tipo IVA (MPSIVA) è una malattia genetica rara, causata dalla mutazione del gene GALNS. Tale mutazione causa l'assenza della proteina N-acetilgalattosamina-6-solfatasi (GALNS), un enzima responsabile della degradazione delle molecole di glicosamminoglicani. Senza essere degradate, queste molecole si accumulano all'interno di compartimenti cellulari, i lisosomi, provocando gravi sintomi scheletrici nei pazienti, a partire da 1 anno di età. Ad oggi, l'unica terapia disponibile per MPSIVA è un enzima sostitutivo, che tuttavia non corregge la

malattia, ma ne attenua solo i sintomi, rendendo necessario lo sviluppo di una terapia innovativa. Alla luce di risultati ottenuti precedentemente presso il nostro istituto, la terapia genica offrirebbe una nuova opzione di trattamento per questi pazienti; tuttavia, non esiste ancora nessun modello di topo sul quale poter testare sicurezza ed efficacia di questa terapia. Pertanto, con questo progetto proponiamo di sviluppare e descrivere un nuovo modello di topo per MPSIVA. Tramite gene editing (alterazione diretta di un gene), abbiamo creato 4 varianti della mutazione di nostro interesse, sul gene codificante per la proteina GALNS. Su questi modelli abbiamo proceduto ad effettuare test biochimici, morfologici, immuno-istologici e comportamentali per definire quale tra le 4 varianti producesse il topo più rappresentativo dei sintomi osservati nei pazienti MPSIVA. Al momento, nessun topo omozigote per la mutazione mostra attività dell'enzima GALNS e tutti presentano un variabile livello di accumulo di Cheratano Solfato nel sangue. Tuttavia, monitorando il peso e le dimensioni macroscopiche nei topi delle 4 varianti, abbiamo osservato come solo uno di questi gruppi si mantenga più piccolo e presenti tibie e femori più corti rispetto a tutti gli altri gruppi. Lo stesso gruppo, inoltre, presenta alterazioni nella composizione delle ossa e nel livello di forza degli arti anteriori, misurato tramite Grip Test. Completando queste analisi sarà possibile selezionare il modello più rappresentativo per MPSIVA ed usarlo per lo sviluppo di una terapia genica innovativa, ampliando e migliorando opzioni terapeutiche per questa malattia.

Disease Name:

Mucopolysaccharidosis type IV A (Morquio syndrome)

Nome malattia:

Mucopolisaccaridosi tipo IVA (Sindrome di Morquio)

Project number:

TGT22C01; TGT22C02

196. AN INNOVATIVE PLATFORM APPROACH FOR THE DEVELOPMENT OF EX-VIVO GENE THERAPIES FOR THE TREATMENT OF LYSOSOMAL STORAGE DISEASES WITH SKELETAL INVOLVEMENT

Crippa S.*^[1], Scala S.^[1], Forni C.^[2], Quaranta P.^[1], Alberti G.^[1], Berti M.^[1], Santi L.^[1], De Ponti G.^[1], Jofra--Hernandez R.^[1], Basso--Ricci L.^[1], Rilievo A.^[1], Visigalli I.^[3], Paoli A.^[4], Consiglieri G.^[5], Tucci F.^[5], Albertini P.^[3], Morrone A.^[4], Parini R.^[1], Gentner B.^[1], Aiuti A.^[1], Bernardo M.E.^[1]

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET) ~ Milan ~ Italy, ^[2]Fondazione Telethon ~ Rome ~ Italy, ^[3]GLP- San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET) ~ Milan ~ Italy, ^[4]Meyer Children's Hospital ~ Firenze ~ Italy, ^[5]Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Lysosomal storage diseases (LSDs) are characterized by the accumulation of undigested macromolecules causing severe multi-organ damage, which the currently approved therapies fail to cure. Previous data obtained by our Institute proved the safety and efficacy of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell-Gene Therapy (HSPC-GT) for the treatment of other LSDs. Building on this experience and the common pathological mechanisms of LSDs, we are proposing HSPC-GT to cure a group of rare/ultra-rare LSDs with skeletal involvement (Mucopolysaccharidosis IVA, Mucopolysaccharidosis IVB, Alpha-Mannosidosis) by using a standardized process in the framework of an innovative platform approach. We optimized Chemistry, Manufacturing and Controls, Non-clinical and Clinical development plans to generate a platform dataset complemented by specific disease data to generate a single combined Clinical Trial Application for clinical testing, moving from the "1-to-1 sequential" drug development to the "simultaneous and parallel" development approach. To this aim, we generated 3rd-generation lentiviral vectors

encoding for each specific enzyme (LV-GALNS, -GLB1, and -MAN2B1) to transduce human HSPCs. Transduced cells showed proper clonogenic and proliferative capacity and significantly overexpressed the functional enzyme. Preliminary data also indicated that the enzymatic activity was restored in patients' derived fibroblasts exposed to the conditioned medium from LV-GALNS and MAN2B1 transduced human HSPCs-derived myeloid cells. Importantly, osteoclasts derived from LV-GALNS and GLB1 transduced cells abundantly secreted the different lysosomal enzymes, possibly serving as a resident enzyme source for skeletal cross-correction. Moreover, LV-GALNS transduced HSPCs engrafted and differentiated in the hematopoietic organs when transplanted in NSG mice. Altogether, our pre-clinical data support the HSPC-GT development for the platform LSD treatment.

SVILUPPO DI UN APPROCCIO PIATTAFORMA INNOVATIVO PER LO SVILUPPO DI PROTOCOLLI DI TERAPIA GENICA PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE CON COINVOLGIMENTO SCHELETRICO

Le malattie da accumulo lisosomiale sono malattie genetiche metaboliche causate dal deficit di enzimi lisosomiali, con conseguente accumulo di macromolecole negli organelli del sistema lisosomiale. L'accumulo di macromolecole danneggia le cellule e i tessuti di diversi organi, tra cui il sistema scheletrico. Le terapie attualmente disponibili non sono efficaci nel curare i danni da accumulo. Diversi studi condotti nel nostro Istituto hanno dimostrato la sicurezza e l'efficacia della terapia genica per il trattamento di alcune forme di malattia da accumulo lisosomiale. La terapia genica si basa sul trapianto di cellule staminali ematopoietiche del paziente corrette in vitro per ripristinare l'espressione dell'enzima mancante. Sulla base dell'esperienza acquisita negli anni e considerando la similitudine dei meccanismi molecolari responsabili delle malattie da accumulo lisosomiali, ci proponiamo di sviluppare dei protocolli di terapia genica per un gruppo di malattie da accumulo lisosomiale rare/ultra-rare, caratterizzate da una grave compromissione scheletrica (mucopolisaccaridosi IVA, mucopolisaccaridosi IVB, alfa-mannosidosi), utilizzando un approccio innovativo di piattaforma. A questo scopo, abbiamo ottimizzato i piani di sviluppo chimico, produzione e controllo e i protocolli di sviluppo pre-clinico e clinico per raccogliere i dati necessari per generare un'unica applicazione di sperimentazione clinica per tre diverse patologie. A questo scopo, abbiamo generato vettori lentivirali per correggere le cellule staminali ematopoietiche del paziente. Ciascun vettore codifica per uno specifico enzima specifico (LV-GALNS, -GLB1 e -MAN2B1). Abbiamo inizialmente testato i vettori lentivirali in cellule staminali ematopoietiche da donatore sano, che hanno mostrato un'adeguata capacità clonogenica e proliferativa post trattamento. Le cellule trattate esprimono l'enzima corretto a livelli significativamente più alti rispetto alle cellule non trattate. Abbiamo anche dimostrato che l'enzima rilasciato dalle cellule staminali ematopoietiche trattate con LV-GALNS e LV-MAN2B1 è in grado di ripristinare l'attività enzimatica nelle cellule dei pazienti. Inoltre, abbiamo generato gli osteoclasti, cellule del sistema scheletrico, a partire dalle cellule staminali ematopoietiche trattate con LV-GALNS e LV-GLB1 e dimostrato che gli osteoclasti rilasciano livelli superfisiologici di enzima. Per questo motivo, pensiamo che possano servire come fonte di enzima residente nel sistema scheletrico, che non è facilmente raggiungibile dalle terapie finora approvate. Complessivamente, i nostri dati preclinici supportano lo sviluppo di protocolli di terapia genica per il trattamento delle malattie da accumulo lisosomiale incluse nello studio piattaforma.

Disease Name:

Mucopolysaccharidosis type IV; alpha-mannosidosis

Nome malattia:

Mucopolisaccaridosi di tipo IV; alfa-mannosidosi

Project number:

TGT22C01; TGT22C02

197. A PRO-INFLAMMATORY SIGNATURE IN PATIENTS WITH LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS DOES NOT PREVENT THE INDUCTION OF TOLEROGENTIC CELLS TO PREVENT UNWONTED IMMUNE RESPONSES IN ENZYME REPLACEMENT THERAPY.

Fortunato M.^[1], Tomasoni D.^[1], Fecarotta S.^[2], Gasperini S.^[3], Bernado M.E.^[1], Parenti G.^[2], Aiuti A.^[1], Passerini L.^[1], Gregori S.*^[1]

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), San Raffaele Scientific Institute (IRCCS) ~ Milan ~ Italy,

^[2]Department of Translational Medical Sciences, Section of Pediatrics, Federico II University ~ Naples ~ Italy,

^[3]Metabolic Rare Diseases Unit, Paediatric Department, San Gerardo Hospital ~ Monza ~ Italy

Enzyme replacement therapy (ERT) is the main treatment for several Lysosomal Storage Disorders (LSDs). Nevertheless, immune responses directed towards recombinant enzymes induce severe adverse inflammatory events in some patients and may limit the efficacy of the therapy. Active induction of immune tolerance is an encouraging strategy to limit unwanted immune responses and foster the efficacy of protein replacement therapy.

Tolerogenic dendritic cell (tolDC)-based therapy represents a promising approach to control immune responses and promote tolerance. In the recent years, we have developed IL-10-based protocols to generate in vitro tolDCs and shown their efficacy in modulating antigen-specific T cell responses in vitro and in vivo.

With the aim of developing engineered tolDC as specific adjuvant immunotherapy for ERT-treated patients to foster enzyme-specific tolerance in LSDs we are currently assessing the immune responses to the missing enzyme in ERT-treated LSD patients; and developing novel tolDC-based therapy to modulate unwanted immune responses to ERT in LSDs.

Analysis of the plasma of ERT-treated pts revealed an increased levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines compared to healthy subjects. In line with this, we observed the upregulation of the expression of activation markers on the myeloid cells and on CD8+ T cells. Despite the activated phenotype, pts-derived CD14+ cells differentiated in functional tolDC that express markers associated with IL-10 induced DC, modulate allogenic CD4+ T cell proliferation and promote Tr1 cells at comparable levels to that of tolDC generated from healthy donors. These data suggest that approaches to differentiate IL-10-producing DC in ERT-treated patients are feasible.

As first step to generate Ag-specific tolDC in LSD patients, we performed an in silico prediction to identify the most immunogenic regions of GALNS (MPSVIa) and GAA (Pompe disease) enzymes, using the immune epitope database (IEDB) resource. We selected some protein fragment for GALNS and for GAA as regions comprising multiple predicted immunogenic epitopes. In vitro testing and validation of the selected region are ongoing. In parallel, to validate the Ag-specific tolDC approach in pre-clinical models of LSDs we are using the α -L-iduronidase (IDUA) deficiency model (MPS-I model). We selected the IDUA sequence comprising immunodominant T cell epitopes, and its sequence has been included in lentiviral vector construct co-encoding for human IL-10 to engineer tolDC, which will be tested in vivo to control ERT-induced immune response.

The overall goal of the project is to find novel and efficient antigen-specific tolerogenic strategies to circumvent adverse immune responses induced by ERT. Results will open the development of tolerogenic therapy that could be used as adjuvant treatments to efficiently circumvent immune response in protein replacement approaches and gene therapy.

La presenza di uno stato infiammatorio nei pazienti con LSD non impedisce l'induzione di cellule tollerogeniche per prevenire risposte avverse all terapia enzimatica sostitutiva.

La terapia enzimatica sostitutiva (ERT) è il trattamento principale per diversi disturbi da accumulo lisosomiale (LSD). Tuttavia, le risposte immunitarie dirette verso gli enzimi ricombinanti inducono, in alcuni pazienti, gravi eventi infiammatori avversi che possono limitare l'efficacia della terapia.

L'induzione attiva di tolleranza immunitaria è una strategia incoraggiante per limitare le risposte immunitarie indesiderate e favorire l'efficacia della ERT.

La terapia cellulare basata sull'uso di cellule dendritiche tollerogeniche (tolDC) rappresenta un approccio promettente per controllare le risposte immunitarie e promuovere la tolleranza. Negli ultimi anni, abbiamo sviluppato protocolli basati su IL-10 per generare tolDC in vitro e dimostrato la loro efficacia nel modulare le risposte delle cellule T antigene-specifiche in vitro e in vivo.

Con l'obiettivo di sviluppare tolDC ingegnerizzate come immunoterapia adiuvante per i pazienti trattati con ERT al fine di favorire la tolleranza immunologica specifica verso enzimi specifici delle diverse LSD, stiamo attualmente studiando le risposte immunitarie verso l'enzima mancante nei pazienti con LSD trattati con ERT; e sviluppando una nuova terapia basata su tolDC.

L'analisi del plasma dei pazienti trattati con ERT ha rivelato un aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie rispetto ai soggetti sani, e la up-regolazione dell'espressione dei marcatori di attivazione sulle cellule mieloidi e sulle cellule T. Nonostante questo, monociti di pazienti con LSD si differenziano in tolDC funzionali, modulano la proliferazione delle cellule T e promuovono le cellule Tr1. Questi dati suggeriscono che gli approcci per differenziare le DC produttrici di IL-10 nei pazienti trattati con ERT sono fattibili.

Per generare tolDC enzima-specifiche nei pazienti con LSD, abbiamo identificato le regioni più immunogeniche degli enzimi GALNS (MPSVIa) e GAA (malattia di Pompe) mediante una predizione in silico. Sono in corso i test in vitro per la validazione degli epitopi identificati. Per convalidare l'approccio tolDC specifico per ERT nei modelli preclinici di LSD, stiamo utilizzando il modello di deficit di α -L-iduronidasi (IDUA). Abbiamo selezionato la sequenza IDUA immunodominante e abbiamo generato un vettore lentivirale codificante per IL-10 e tale epitopo per ingegnerizzare tolDC, che saranno testato in vivo.

L'obiettivo generale del progetto è trovare nuove ed efficaci strategie tollerogeniche antigene-specifiche per modulare le risposte immunitarie avverse indotte dall'ERT. I risultati apriranno lo sviluppo della terapia tollerogenica che potrebbe essere utilizzata come trattamento adiuvante per aggirare efficacemente la risposta immunitaria negli approcci di sostituzione proteica e nella terapia genica.

Disease Name:

Mucopolysaccharidosis; Pompe Disease

Nome malattia:

Mucopolisaccaridosi; Malattia di Pompe

Project number:

TGT22C09

198. INDUCTION OF AUTOPHAGY PATHWAY AS NEW THERAPEUTIC OPTION TO PREVENT THE SYSTEMIC PATHOLOGY IN MULTIPLE SULFATASE DEFICIENCY (MSD)

Cacace V., Sofia M., Rossi B., Strollo S., Brunetti--Pierri N., Ballabio A., Medina D.L., Sorrentino N.C.*

TIGEM ~ POZZUOLI (NA) ~ Italy

Multiple sulfatase deficiency (MSD) is a ultrarare lysosomal storage disorder (LSD) characterized by the deficiency of all known sulfatases that in turn cause the systemic pathology with a strong involvement of central nervous system (CNS). The main clinical features of MSD include brain disorder with developmental delay, loss of acquired developmental milestones, leukodystrophy, skeletal abnormalities, organomegaly and ichthyosis. To date, there are no curative therapies for MSD disorder. The main challenge in the treatment of this severe disorder is to develop an

effective therapeutic approach able to target the systemic tissues and in particular the CNS. Strong evidence on the cellular mechanisms underlying the LSD pathologies indicate the relevance of the autophagy impairment as one of the pivotal mechanisms involved in the progression of systemic pathology. Thus, the development of small molecule-based therapeutics capable to induce the autophagy and cross the blood-brain barrier could be of particular interest to treat the somatic and CNS pathology. In a previous work, we developed new MSD hypomorphic mouse models which better recapitulate the human condition and selected the mutant mice bearing Sumf1 variant p.Ser153Pro as MSD model for testing novel therapeutic approaches. By using a cell-based high content assay, we identified the selective serotonin reuptake inhibitor, Fluoxetine, an FDA approved drug commonly prescribed to manage some neurological disorders. Interestingly, in vivo Fluoxetine treatment in the MSD p.Ser153Pro mice promotes improvement of storage pathology by restoring the autophagy flux, decreasing the accumulation of GAGs in somatic and brain tissues together with rescue of the retinal function and behavioral abnormalities. Altogether, these results open new prospective for using the Fluoxetine compound to restore the lysosomal function and ameliorate the systemic pathology in MSD and in other LSD disorders with somatic and CNS involvement.

Il deficit multiplo di solfatasi (MSD) è una malattia da accumulo lisosomiale (LSD) ultra-rara caratterizzata dal deficit di tutte le solfatasi che causano una patologia sistemica con un forte coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC). Le principali caratteristiche cliniche della MSD includono disturbi cerebrali come ritardo dello sviluppo, leucodistrofia, anomalie scheletriche, organomegalia ed ittiosi. Ad oggi, non esistono terapie curative per il disturbo MSD. La sfida principale nel trattamento di questo grave disturbo è sviluppare un approccio terapeutico efficace in grado di colpire i tessuti sistemici e in particolare il SNC. Forti evidenze sui meccanismi cellulari alla base delle patologie da LSD indicano la rilevanza della compromissione dell'autofagia come uno dei meccanismi cardine coinvolti nella progressione della patologia sistemica. Pertanto, lo sviluppo di terapie a base di piccole molecole in grado di indurre l'autofagia e attraversare la barriera emato-encefalica potrebbe essere di particolare interesse per il trattamento della patologia somatica e del SNC. In un precedente lavoro, abbiamo sviluppato nuovi modelli murini ipomorfi MSD che ricapitolano meglio la condizione umana e selezionato i topi mutanti portatori della variante Sumf1 p.Ser153Pro come modello MSD per testare nuovi approcci terapeutici. Utilizzando uno screening cellulare, abbiamo identificato l'inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina, Fluoxetina, un farmaco approvato dalla FDA comunemente prescritto per gestire alcuni disturbi neurologici. Noi abbiamo osservato che il trattamento con fluoxetina in vivo nei topi MSD p.Ser153Pro promuove il miglioramento della patologia da accumulo ripristinando il flusso autofagico, diminuendo l'accumulo di GAG nei tessuti somatici e cerebrali insieme al salvataggio della funzione retinica e alle anomalie comportamentali. Complessivamente, questi risultati aprono nuove prospettive per l'utilizzo del composto Fluoxetina per ripristinare la funzione lisosomiale e migliorare la patologia sistemica in MSD e in altre patologie da accumulo lisosomiale con coinvolgimento somatico e del SNC.

Disease Name:

Multiple sulfatase deficiency

Nome malattia:

Deficit multiplo di solfatasi

Project number:

TGM22MT09

Rare genetic diseases in general

199. MEMBRANE REARRANGEMENTS DURING SARS-COV-2 INFECTION

Sergio M.C.*, Ricciardi S., Di Tullio G., Santoro M., Giaquinto L., Guarino A., Wilson C., Polishchuk E., Polishchuk R., Venditti R., De Matteis M.A.

Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli ~ Italy

SARS-CoV-2 belongs to the coronavirus family, which comprises enveloped viruses with a large, single-stranded, positive-sense RNA genome.

SARS-CoV-2 infection is known to induce huge intracellular membrane rearrangements to sustain its life cycle into the host cell.

We focused our attention on two less characterized steps of SARS-CoV-2 life cycle which are replication organelles (ROs) formation and virion assembly and budding.

The SARS-CoV-2 RO is composed of double membrane vesicles (DMVs) linked to the endoplasmic reticulum (ER) by connectors, but the viral proteins and the host factors involved are currently unknown.

We studied the Nsp3, Nsp4 and Nsp6 role in ROs formation: Nsp3, Nsp4 create specialized DMVs where the viral genome is replicated; NSP6, squeezes the ER compartment promoting the formation of zippered ER membranes as connectors between DMVs and ER.

We hypothesized a novel role of Nsp6 in ER membranes rearrangement and ROs formation: NSP6 acts as a filter of proteins and lipids between DMVs and ER, orchestrates the distribution of DMVs clusters and interacts with DFCP1-Rab18 complex to contact LDs, that fuel the replication in SARS-CoV-2 infection.

Instead, viral assembly takes place at the ERGIC where viral structural proteins (M, N, S and E) and the viral RNA assemble into virions that bud into the ERGIC lumen and traverse the secretory pathway to be released.

We studied the role of the E protein in virion assembly and budding. In addition to its known localization at the ERGIC-Golgi, we found that it is also enriched in intraluminal vesicles (ILVs) of multivesicular bodies (MVBs). ILV biogenesis is topologically equivalent to virion budding, as both are inward budding events. We searched for host cell interactors that might mediate E protein budding into ILVs and found a significant interaction with Syntenin, which is known to promote ILV biogenesis. Importantly, we show that the E protein can recruit Syntenin at the Golgi and that this interaction is functional for the subsequent recruitment of Alix and CHMP4B which are, respectively, an accessory protein and a component of the ESCRT machinery that are required for inward budding. These findings suggest a model in which the E protein recruits Syntenin at the Golgi to activate the Alix-dependent ESCRT pathway allowing the budding of virions into the lumen of the Golgi complex.

Studying the membrane rearrangements induced by viral infection could add new knowledge regarding the key players (proteins, lipid composition) that support membrane curvature and reshaping in physiological and pathological conditions.

RIARRANGIAMENTI DI MEMBRANE NELL'INFEZIONE DA COVID-19

Il SARS-CoV-2 appartiene alla famiglia dei coronavirus, che comprende virus a RNA a singolo filamento.

L'infezione da SARS-CoV-2 induce riarrangiamenti delle membrane intracellulari che sostengono il ciclo vitale del virus nella cellula ospite. Ci siamo focalizzati sulle due tappe meno caratterizzate del ciclo vitale del SARS-CoV-2: la formazione degli organelli di replicazione e l'assemblaggio e la gemmazione del virione.

L'organello di replicazione del SARS-CoV-2 è composto da vescicole a doppia membrana collegate al reticolo endoplasmatico da connettori, ma le proteine virali e cellulari coinvolte sono

attualmente sconosciute.

Abbiamo studiato il ruolo di Nsp3, Nsp4 e Nsp6 nella formazione degli organelli di replicazione: Nsp3 e Nsp4 creano le vescicole a doppia membrana dove viene replicato il genoma virale; NSP6 comprime il reticolo endoplasmatico promuovendo la formazione di connettori tra le vescicole e il reticolo endoplasmatico.

Abbiamo ipotizzato un ruolo inedito di Nsp6 che agisce come un filtro di proteine e lipidi tra le vescicole e il reticolo endoplasmatico, organizza la distribuzione dei cluster delle vescicole e interagisce con il complesso DFPC1-Rab18 per contattare le goccioline lipidiche, che alimentano la replicazione nell'infezione SARS-CoV-2.

L'assemblaggio virale avviene invece a livello dell'ERGIC, dove le proteine strutturali virali (M, N, S ed E) e l'RNA virale si assemblano in virioni che gemmano nel lume dell'ERGIC e attraversano la via secretoria per essere rilasciati.

Abbiamo studiato il ruolo della proteina E nella formazione del virione. Oltre alla sua nota localizzazione nell'ERGIC-Golgi, abbiamo scoperto che è arricchita anche nelle vescicole intraluminali degli endosomi. La biogenesi di queste vescicole è topologicamente equivalente alla formazione del virione. Abbiamo cercato le proteine della cellula ospite che potrebbero mediare la localizzazione della proteina E nelle vescicole e abbiamo trovato un'interazione significativa con sintenina, proteina già nota per il suo ruolo nella biogenesi delle vescicole endosomiali. Abbiamo dimostrato che la proteina E può reclutare sintenina nel Golgi che a sua volta recluta Alix e CHMP4B, proteine del macchinario ESCRT, necessarie per la formazione delle vescicole intraluminali. Questi risultati suggeriscono che E possa reclutare sintenina al Golgi per attivare il macchinario ESCRT-Alix, consentendo l'invaginazione dei virioni nel lume del complesso del Golgi. Lo studio dei riarrangiamenti delle membrane intracellulari indotti dall'infezione virale può essere fondamentale per acquisire nuove conoscenze sulle proteine e sui lipidi responsabili di rimodellare le membrane in condizioni fisiologiche e patologiche.

Disease Name:

COVID-19

Nome malattia:

COVID-19

Project number:

TGM22CBDM07

200. MOLECULAR DETERMINANTS OF VIRAL PATHOGENESIS

Stelitano D., Bianco G., Kaesler F., Marano V., Tiano S.M.L., Vlachová Š., Cortese M.*

TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy

Upon infection, positive-sense single-stranded RNA (+RNA) viruses remodel the host endomembrane system to create an environment conducive to viral replication. The most striking among the alterations induced by the infection of +RNA viruses is the formation of the viral replication organelle (RO), a specialized membrane-delimited organelle where the viral genome replication takes place. For SARS-CoV-2 the etiological agent of the COVID-19 disease, the viral ROs are composed of double membrane vesicles that originate from and are in contact with the endoplasmic reticulum. Additionally, SARS-CoV-2 infection induces a strong reshaping of all cellular organelles, such as the fragmentation of the Golgi apparatus and the relocalization of the peroxisomes and of the cytoskeleton. The remodeling of the cellular landscape might contribute to the cytopathogenic effect observed during SARS-CoV-2 infection. To date, the host and viral factors and the molecular mechanisms that bring to the formation of the viral ROs and are

responsible for the cellular alterations induced by SARS-CoV-2 are still unknown. By integrating cutting edge imaging approaches, such as cryo-EM, with genetic perturbation screens we will identify host-dependency factors co-opted by the virus and shed light on the molecular and structural determinants required for SARS-CoV-2 replication. We will provide insights into ROs biogenesis and their role in coordinating the different steps

of SARS-CoV-2 replication and identify key macromolecular complexes and cellular processes that contribute to SARS-CoV-2 cytopathogenicity. Such complexes and process might be used to develop novel antiviral strategies that will allow to control viral replication and to curb SARS-CoV-2 spread.

L'infezione da SARS-CoV-2 induce un rimodellamento della cellula ospite, alterandone le strutture cellulari e modificandone i pathway biosintetici. Tra queste alterazioni, la più prominente è la formazione di strutture specializzate chiamate "organelli replicativi virali" all'interno delle quali avviene la replicazione del genoma. Tali strutture vengono create non solo a partire da proteine virali, ma anche tramite il contributo di fattori cellulari che vengono "hackerati" durante l'infezione e reindirizzati in modo da contribuire alla replicazione del virus. Ad oggi non si conoscono quali fattori cellulari supportino la replicazione virale e la formazione degli organelli replicativi. Inoltre, l'alterazione degli organelli cellulari è un fattore che contribuisce all'effetto citopatogenico, ovvero alla "morte cellulare", indotta dall'infezione di SARS-CoV-2. Chiarire quali siano i fattori cellulari coinvolti nella biogenesi degli organelli replicativi virali, e quali sono i meccanismi molecolari alla base della citopatogenicità virale, ci darà la possibilità di identificare nuovi bersagli per lo sviluppo di farmaci antivirali in grado di fermare non solo l'infezione da SARS-CoV-2 ma anche le infezioni future prodotte da virus con caratteristiche replicativi simili.

Disease Name:

COVID-19

Nome malattia:

COVID-19

Project number:

TGM22CBDM12

201. TELETHON NETWORK OF GENETIC BIOBANKS: A KEY SERVICE FOR DIAGNOSIS AND RESEARCH ON RARE DISEASES

Casareto L.^[1], Coviello D.^[2], Zecchinelli A.^[3], Renieri A.^[4], Pegoraro E.^[5], Sciacco M.^[6], Andreetta F.^[7], Merla G.^[9], Nigro V.^[8], Garavaglia B.^[7], Sangiorgi L.^[1]

^[1]Istituto Ortopedico Rizzoli ~ Bologna ~ Italy, ^[2]Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[3]ASST Gaetano Pini - CTO ~ Milano ~ Italy, ^[4]Università di Siena - Azienda Ospedaliera Universitaria Senese ~ Siena ~ Italy, ^[5]Università di Padova - Azienda Ospedaliera Universitaria ~ Padova ~ Italy, ^[6]Centro Dino Ferrari, IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Università di Milano ~ Milano ~ Italy, ^[7]Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta ~ Milano ~ Italy, ^[8]Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Azienda Ospedaliera Universitaria "Luigi Vanvitelli" ~ Napoli ~ Italy, ^[9]IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza ~ San Giovanni Rotondo FG ~ Italy

The Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB) is a non-profit organisation of 11 Italian biorepositories created in 2007 to interconnect them through a centrally coordinated IT web-based platform. Its general mission is to support research on rare diseases by facilitating access to quality biospecimens and associated data of interest to the scientific community, patients, and families (Filocamo et al, 2013).

In 16 years of activity, several improvements have been achieved thanks to the development of the

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 1,500 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. On these aspects, a meticulous analysis of all the requests rejected by the Access Committee has been conducted allowing to highlight the strategies applied by TNGB to manage and control access to its collection. The discussion of the results was an opportunity to reflect on open issues and concerns in access governance and their space for implementation (Iacomussi et al, 2021).

As distribution service, the TNGB samples have produced impressive results in the field of rare diseases leading to the publication of more than 800 scientific manuscripts.

Furthermore, the TNGB has always been aware of the importance of biobanking as a service for patients, indeed it has been carrying out several activities with the objective of patient/lay member engagement: firstly, by including their representatives on the TNGB Advisory Board and then by actively involving them in drafting biobank policies and procedures, including those concerning ELSI aspects. This constant face-to-face interaction has increased awareness, trust and interest in the biobanking service which has been formalised by an innovative ad-hoc agreement model which has enabled the centralisation of rare disease samples and linked data, making them available through the online catalogue to the scientific community worldwide (Baldo et al, 2016).

Concerning the ELSI field, TNGB has been continuing its extensive work involving lay members of Patient Organisations and experts; in particular, the informed consent template has been remodelled in the framework of a laboratory where the TNGB informed consent model became a training ground to implement the BBMRI.it matrix. This participatory laboratory 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 also continued its interaction with other European biobanking realities, such as BBMRI, EuroBioBank network, EJP RD and the European Reference Networks on Rare Diseases.

RETE TELETHON DI BIOBANCHE GENETICHE

Le Biobanche di Malattie Rare sono unità di servizio non-profit, finalizzate alla raccolta, conservazione e distribuzione di campioni biologici con l'obiettivo di conservare nel tempo campioni biologici secondo elevati standard di qualità, e renderli disponibili successivamente per la diagnosi e la ricerca.

La Rete Telethon di Biobanche Genetiche (TNGB) è un'organizzazione senza scopo di lucro costituita nel 2007 per interconnettere 11 biobanche qualificate distribuite sul territorio italiano centralizzando i campioni in un unico catalogo (<http://biobanknetwork.telethon.it/>) e migliorando l'accesso ai servizi; il tutto finalizzato a garantire la qualità dei campioni e la tutela della privacy per i partecipanti durante l'intero percorso. La Rete, attraverso le Biobanche affiliate, raccoglie linee cellulari, DNA e tessuti; ad oggi, sono conservati quasi 130.000 campioni per circa 1.500 differenti difetti genetici. Oltre alla standardizzazione e all'armonizzazione delle procedure, l'adozione di una piattaforma informatica centralizzata ha consentito lo sviluppo di una politica comune di accesso, basata su criteri predefiniti che assicura trasparenza e imparzialità (Filocamo et al, 2013).

Inoltre, il TNGB ha svolto diverse attività con l'obiettivo di coinvolgere i pazienti e la comunità: in primo luogo, includendo un loro rappresentante nel Comitato consultivo e poi coinvolgendoli attivamente nella stesura delle politiche e delle procedure per le biobanche, comprese quelle relative agli aspetti etiche, sociali e legali (ELSI). Questa costante interazione ha aumentato la consapevolezza, la fiducia e l'interesse per il servizio di biobanca che è stato formalizzato tramite un modello di accordo innovativo che ha permesso di centralizzare i campioni di malattie rare e i

data associati, rendendoli disponibili attraverso catalogo online alla comunità scientifica mondiale (Baldo et al, 2016).

Per quanto riguarda le tematiche ELSI, TNGB ha lavorato con le Associazioni di Pazienti ed esperti del settore nell'ambito di un laboratorio partecipativo di BBMRI.it alla stesura di un modello di consenso informato sempre più completo ed articolato 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.

Inoltre, riguardo alle politiche di accesso è stata condotta un'analisi puntuale di tutte le richieste rifiutate dal Comitato di Accesso che ha permesso di evidenziare le strategie applicate da TNGB per gestire e controllare l'accesso alla propria collezione. La discussione dei risultati è stata un'opportunità per riflettere sulle questioni aperte relativamente alle procedure legate alle politiche di accesso e alla loro implementazione (Iacomussi et al, 2021).

La TNGB continua infine ad interagire attivamente con altre realtà europee, come BBMRI, EuroBioBank e EJP-RD e le reti ERN.

Disease Name:

Rare genetic diseases in general

Nome malattia:

Malattie genetiche rare in generale

Project number:

GTB18001

202. TIGEM SCIENTIFIC OFFICE

Diex Roux G., Bouchè V., Forzati F., Rotoli V., Sanges D.*, Summaria B., Zimbardi B.

TIGEM ~ Naples ~ Italy

The Scientific Office at Tigem, led by Dr Graciana Diez-Roux, works alongside the researchers supporting their work at basic, translation and clinical levels of biomedical discovery. The key roles of the TSO are to facilitate the Institute's biomedical research and to maintain an environment that fosters innovation, collaboration, and scientific achievement.

TSO main activities include Scouting, Grant and Project Management, where it acts as liaison between researchers and sponsoring agencies and assists the researchers in providing administrative and managerial skills to facilitate access to funding sources. It also manages European Commission and National Programs that TIGEM coordinates or in which it is involved. The TSO helps in managing 3 PhD Training Programs and supports students from an administrative point of view facilitating the relationship with the University and scientifically, supporting them in preparing their periodical reports and presentations.

An additional key role of the TSO is to work alongside the Telethon Alliance, Management and Regulatory Affairs office to assist and guide research scientists in the regulatory processes required to bring innovative therapeutic products and strategies developed at TIGEM from bench to bedside. Moreover, the TSO collaborate with the Telethon Technology Transfer and the Business Development Office to enable innovative research partnerships and negotiates sponsored and collaborative contracts with industry.

The TSO has also an important role in the Communication since it publicizes news and updates regarding the Institute's activities and progress through internal and external communications and it also organises, advertises, and ensures the smooth running of all TIGEM seminars and data

clubs as well as scientific and awareness events.

The Scientific Office at Tigem, led by Dr Graciana Diez-Roux, works alongside the researchers supporting their work at basic, translation and clinical levels of biomedical discovery. The key roles of the TSO are to facilitate the Institute's biomedical research and to maintain an environment that fosters innovation, collaboration, and scientific achievement.

TSO main activities include Scouting, Grant and Project Management, where it acts as liaison between researchers and sponsoring agencies and assists the researchers in providing administrative and managerial skills to facilitate access to funding sources. It also manages European Commission and National Programs that TIGEM coordinates or in which it is involved. The TSO helps in managing 3 PhD Training Programs and supports students from an administrative point of view facilitating the relationship with the University and scientifically, supporting them in preparing their periodical reports and presentations.

An additional key role of the TSO is to work alongside the Telethon Alliance, Management and Regulatory Affairs office to assist and guide research scientists in the regulatory processes required to bring innovative therapeutic products and strategies developed at TIGEM from bench to bedside. Moreover, the TSO collaborate with the Telethon Technology Transfer and the Business Development Office to enable innovative research partnerships and negotiates sponsored and collaborative contracts with industry.

The TSO has also an important role in the Communication since it publicizes news and updates regarding the Institute's activities and progress through internal and external communications and it also organises, advertises, and ensures the smooth running of all TIGEM seminars and data clubs as well as scientific and awareness events.

Disease Name:

Rare genetic diseases in general

Nome malattia:

Malattie genetiche rare in generale

Project number:

TGM22CBDM06

Undiagnosed diseases with proven genetic origin

203. TELETHON UNDIAGNOSED DISEASES PROGRAM: THE 2022 MUTATION UPDATE

Torella A.^[1], Morleo M.^[1], Pinelli M.^[2], Spampanato C.^[3], Zanolio M.^[3], Zeuli R.^[3], Tirozzi A.^[3], Onore M.E.^[3], Bonolis V.^[3], Mutarelli M.^[4], De Riso G.^[2], Varavallo A.^[1], Banfi S.^[1], Brunetti N.^[1], Telethon Undiagnosed Disease Program S.G.^[1], Nigro V.^[1]

^[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) ~ Pozzuoli ~ Italy, ^[2]Department of Translational Medicine, Section of Pediatrics, Federico II University ~ Naples ~ Italy, ^[3]Department of Precision Medicine, University of Campania "Luigi Vanvitelli" ~ Naples ~ Italy, ^[4]Institute of Applied Sciences and Intelligent Systems, National Research Council (CNR-ISASI) ~ Pozzuoli ~ Italy

The Telethon Undiagnosed Diseases Program (TUDP) is a multicenter Italian national program that started as the Pilot Program in 2016 and a new TUDP 2.0 restarted in 2021 with the aim of identifying new genes mutated in pediatric onset monogenic rare diseases. From 2016 to date, 1188 families have been evaluated. Most cases are of major severity: these children usually show severe multisystem manifestations, neurological involvement and dysmorphism, but remain undiagnosed. To date, the TUDP have solved almost 50% of these unsolved cases. Mutations in known genes of known diseases were identified for 79% of cases, while for the remaining 21% of families disease-causing variants were identified in new genetic diseases, discovered while the TUDP study was ongoing. Compound-Heterozygous (12%) or homozygous (10%), de novo (68%) and X-linked (7% inherited from mother and 3% de novo X-linked) mutations were identified. During the Project we learned three things: first, the TUDP benefited from a highly selective and rigorous clinical evaluation, but it was of fundamental importance to produce a useful, rich, and specific list of phenotypic terms. Second point, whole exome sequencing (WES) in trio is the obligatory choice of entry, due to the enormous advantages in terms of costs / benefits compared to other strategies, but there has been a need for continuous improvement of the quality of the wet data thanks to the new kits and to re-sequence cases after some time. Finally, the periodic re-evaluation of the cases with new bioinformatics tools, new literature, and matchmaking led to the solution of about 30% more cases. We believe that the reanalysis of still unsolved cases through more expensive technologies, such as long-read WGS and RNASeq, can benefit an additional portion of patients, albeit with very small percentages. We are testing these additional tools to establish access criteria, considering the costs and the yield

Programma Telethon "Malattie senza diagnosi": aggiornamento al 2022

Disease Name:

Undiagnosed diseases

Nome malattia:

Malattie senza diagnosi

Project number:

GSP15001

Authors' Index (page numbers)

A

Abati E.	147	Amoresano A.....	224
Abboud D.....	185	Amoruso F.	170
Abiusi E.	37	Anastasia A.....	147
Abou--Alezz M.	41	Anastasia L.	136
Abrignani S.....	227	Andrea B.	85
Achsel T.....	98	Andrea C.	134
Adani E.....	189	Andreazzoli M.	103
Agostinis R.	234	Andreetta F.....	281
Aigner A.	156	Andrews--Zwilling Y.S.	12
Aita A.	17	Anfuso B.....	225
Aiuti A.	136; 204; 218; 219; 268; 273; 274; 276	Angiolillo S.	96; 132
Albamonte E.	11; 27	Annarita M.	214
Albanese F.....	134	Anselmi F.....	208
Albano C.	162	Anthony L.....	91
Alberini G.....	88	Antonini D.	246
Alberti G.	268; 273; 274	Antonini F.	1
Albertini A.....	219	Antonucci F.....	109
Albertini P.	274	Arboit M.....	132
Alessandra S.....	214	Arcari A.	108
Alessia M.	103	Argenton F.....	57
Alessio M.	117	Arnese R.	255
Alfarano M.....	257	Arnold S.....	44
Allegra Mascaro A.L.	177	Arrigoni G.....	17; 44
Alloisio S.	47	Asahi O.	139
Alloni A.	32	Asperti C.....	228
Alraies Z.	230	Assanelli S.	208
Altieri A.....	225	Astrea G.	11; 27
Amadio R.	230	Augusto M.C.....	64
Amato S.	132	Auricchio A.	191
Amenta A.....	121	Auricchio S.	191
Ami D.	200	Ayub M.....	48
Amodei L.....	61		
		B	
		Babini G.....	40

XXI CONVENTION SCIENTIFICA 13-15 MARZO 2023

Bachetti T.	198	Basso D.	17
Baci D.	26	Basso-Ricci L.	204; 218; 273; 274
Baggiani M.	128	Bastille A.	224
Bagnato G.	257	Battaglini D.	64
Bagni C.	98	Battaglioli E.	106
Balboni N.	40	Battini R.	4; 7
Baldassari S.	49	Battistini J.	26
Baldelli P.	88	Becca M.V.	81
Baldi R.	144; 175	Becerra S.P.	189
Baldin S.	74; 76	Beckers A.	185
Balestra D.	110	Belardinilli F.	64
Ballabio A.	277	Bellinazzi B.	105
Balmaceda V.	42	Bellini E.	101
Banfi F.	101	Bellini S.	65
Banfi S.	56; 187; 285	Bellitto D.	168
Banka S.	101	Bello L.	4; 9
Baraldo M.	17	Belloli S.	117
Baratto S.	1	Belloni F.	101
Barbato S.	56	Bellotti V.	163; 200
Barbero A.	268	Benedicenti F.	219
Barbieri R.	47; 94	Benetollo A.	2; 120
Barbiero I.	74; 76	Benfante R.	45
Barbon E.	265	Benfenati F.	49; 88
Barcella M.	157; 159; 218	Benvenuti F.	230
Barilà S.E.	175	Benzi A.	1
Barile S.N.	40	Berardinelli Angela	27
Baroncelli L.	95	Berardinelli Angela Lucia	4; 7
Baronchelli F.	92	Beretta Stefania	112
Bartolucci M.	198	Beretta Stefano	221; 232
Baruffini E.	57	Berlingieri C.	71
Barutta F.	65	Bernado M.E.	276
Barzagli F.	204	Bernardi P.	15
Baschiera E.	39	Bernardi S.	139
Baselli L.	227	Bernardo M.E.	218; 268; 273; 274
Basini T.	273	Berno V.	127
Bassani S.	80	Berti B.	9

XXI CONVENTION SCIENTIFICA 13-15 MARZO 2023

Berti M.	268; 273; 274	Bonolis V.	285
Bertini E.	263	Bonora M.	65
Bertini V.	250	Bordone R.	29
Bertino F.	65	Borghi E.	78
Bertocchi M.	45	Borghi R.	176
Bertocco A.	124	Borrelli A.	242
Besio R.	153	Borsotti C.	208
Biagini T.	173	Bosco M.C.	253
Biagioni M.	92	Bottani E.	118
Bianca L.	171	Bouchè V.	283
Bianco G.	280	Bozzo M.	168
Biasini E.	149	Brambilla F.	200
Biasizzo J.	258	Brañas Casas R.	57
Biasutto L.	53	Brandi P.	187
Bifari F.	121	Bresolin N.	147
Biffi M.	221; 265	Briani F.	32
Bighinati A.	189	Brini M.	153
Bindoff L.	71	Brischigliaro M.	42; 44; 53; 55
Bione S.	173	Broccoli V.	81; 101; 103; 105; 132
Biressi S.	12	Brombin C.	232
Bizzotto M.	138	Brondi M.	84
Blaauw B.	6; 17	Brunetti D.	71
Bocciardi R.	49	Brunetti M.E.	234
Boda E.	104	Brunetti N.	285
Boeckers T.	112	Brunetti–Pierri N.	277
Boggio S.	231	Bruno C.	1; 4; 7
Bogialli S.	44	Bruno I.	36
Boido M.	34; 36	Bruno M.	85
Bolamperti S.	273	Brusco S.	81
Bolino A.	145	Bruzzo S.	1
Boltje T.J.	131	Buccirossi M.	242
Bonacina F.	261	Buffo A.	104
Bonaldo P.	15; 17; 34	Bujanda Cundin X.	272
Bonato M.	104	Bulté D.	204
Bonesso D.	53	Buonomo V.	14
Bono S.	147	Bury L.	205; 216

Busnelli M. 80

C

Cabrera–Orefice A. 44

Cacace V. 277

Cacchiarelli D. 191; 247

Caccin P. 2; 120

Caiello I. 263

Calabria A. 219

Calbi V. 136; 219

Caliceti P. 188

Calistri A. 249

Calugi F. 95

Cambria C. 109

Camilloni C. 164

Cammarota E. 127; 221

Campione S. 224

Canarutto D. 219; 228

Cancila V. 231

Candiani S. 168

Candini G. 75

Canepari C. 221

Canetti D. 200

Canettieri G. 29

Cangelosi D. 253

Cannizzaro N. 132

Canonico F. 21

Cantarutti C. 163

Canton M. 2

Cantore A. 221; 265

Capasso D. 187

Capasso P. 208

Capirossi G. 87

Capo V. 159; 268

Capocci L. 131; 132

Capocefalo D. 115

Capolongo F. 187; 224

Cappato S. 49

Cappelleri A. 159

Cappelluti Martino 70

Cappelluti Martino Alfredo 133; 265

Capristo M. 87

Capuozzo A. 271

Capurro V. 241

Caramello A. 170

Carbognin E. 132

Cardinali B. 26

Cardona F. 262

Carelli E. 227

Carelli S. 120

Carelli V. 87

Caria C. 201

Cariboni A. 170

Caricasole A. 117

Carmone C. 74; 76

Carotti M. 2; 120

Carra S. 146

Carrabba M. 227

Carraro E. 2

Carrella S. 56; 187

Carrozzo R. 263

Carsetti C. 125

Cartelli D. 147

Casareto L. 281

Casari G. 127

Casarotto E. 34

Casciello M. 194

Cascino F. 121; 123

Cascone A. 194

Caserta L. 235

Castagnaro S. 15; 17

Castagnola V. 49

XXI CONVENTION SCIENTIFICA 13-15 MARZO 2023

Castellani G.	90	Cillo M.	234
Castelli R.	83	Cingolani L.	60
Castiglioni I.	41	Cinquina V.	250
Catalano F.	222	Ciofi--Baffoni S.	31
Catanese A.	112	Ciolfi S.	152
Cattaneo E.	129	Cipriani S.	145
Catteruccia M.	9	Cirillo C.	14
Cavalluzzi M.M.	164	Civino A.	253
Cavan S.	173	Claessens A.	144
Cazzato D.	147	Claudia B.	91
Ceccherini I.	196; 198	Claus P.	36
Celeghin R.	57	Clemente F.	227; 262
Celli L.	173	Cocozza S.	67
Cencelli G.	98	Coculo L.	152
Cenci S.	154	Coglot A.	70; 133
Cereda C.	120	Cogo P.	193
Cerutti R.	42	Cohen M.	15
Cervellini F.	235	Colasante G.	81
Cesana D.	219	Colombi M.	250
Cesare E.	96	Comi Giacomo	11; 147
Cescon M.	17; 34	Comi Giacomo Pietro	7
Cestra G.	125	Compagnucci C.	176
Cheroni C.	113	Conci A.	248
Chiabrando D.	65	Condoluci C.	173
Chiarelli N.	250	Coni S.	29
Chierichetti M.	34	Consiglieri G.	268; 274
Chiesa R.	62	Consolaro A.	253
Chini B.	90	Conte I.	190
Choufani S.	113	Contento B.	153
Ciampoli M.	90	Conti Anastasia	232
Ciani E.	75	Conti Antonio	117
Ciapponi L.	29	Conti J.	241
Ciarpella F.	118; 121	Conti L.	99; 225
Cicalese M.P.	218	Contini A.	99
Ciceri F.	218; 219	Coppa C.	99
Cicio G.	231	Coppola Maria Antonietta	94

Coppola Maria Rosaria Coppola	168	D'Abrusco F.....	171
Corazza A.	163; 200	Dadà L.	95
Corcelli A.....	256	D'Adamo P.....	273
Cordiglieri C.	147	D'Adda Di Fagagna F.	231
Cornuti S.	78	Dalla Barba F.....	120
Corrà S.	42; 53	Dalla Valle L.	57
Corradi A.....	88	Daly A.	185
Corradi B.	88	D'Amario D.....	21
Corsi A.....	64; 268	D'Amati G.	87
Corsinovi D.....	170	Damiani D.....	68; 128; 135
Cortese M.	280	Damiani F.....	78
Corti S.	147	D'Amico A.....	4; 7; 11; 27
Costa R.....	53	D'Amico R.....	29
Costantini P.	31	D'Angelo M.G.	11
Covello G.....	127	Daniela R.	91
Coviello D.....	281	D'Annunzio S.	182; 183
Cozzi A.	142	D'Antonio M.....	144
Cozzi M.	34	Dardis A.....	258
Crasto S.....	162	Darin S.....	218
Cratere M.....	237	D'Auria L.....	246
Crea F.....	21	Davighi M.G.....	262
Crippa S.....	268; 273; 274	De Benedetti F.....	263
Crippa V.....	34	De Blasis R.....	144
Crisafulli L.	159; 211	De Carli A.....	244
Crisuolo S.	79	De Cegli R.	79; 222; 235
Crispino R.....	222	De Chirico F.....	40
Cristofani R.	34	De Franceschi L.	215
Crivellari L.	144	De Gioia R.....	147
Crosti M.	227	De Gregorio E.	171
Cuadros Gamboa A.L.	45	De Guzman E.....	95
Cucci A.	208	De Leonibus E.....	56; 271; 272
Cusimano L.	272	De Luca M.	248
Cutruzzola" F.....	152	De Marco R.....	232
<hr/>		De Matteis M.A.	235; 260; 279
D		De Mattia F.....	219
D'angelo M.G.	4	De Mori R.	173

De Palma G.	117	Di Guardo R.	145
De Panfilis S.	64	Di Guida M.	187
De Ponti G.	268; 273; 274	Di Lascio S.	45
De Rasmò D.	256	Di Lillo A.	231
De Risi M.	56; 271; 272	Di Malta C.	236
De Riso G.	285	Di Meo I.	142
De Rosa R.	74; 76	Di Micco R.	218; 232
De Sarlo M.	179	Di Nottia M.	263
De Simone A.	269	Di Nunzio M.	92
De Smaele E.	64	Di Pardo A.	131; 132
De Stefani D.	33	Di Pasquale E.	162
De Tomi E.	118	Di Pietro C.	249
Decimo I.	118; 121	Di Schiavi E.	222
Del Carro U.	144	Di Silvestre D.	200
Del Dotto V.	87	Di Soccia A.	84
Del Zotto J.	1	Di Tullio G.	279
Dell'aquila F.	191	Di Vetta F.	95
Della Porta M.G.	211	Diamante L.	132
Della Sala A.	241	Diciotti S.	72
Della Vecchia S.	135	Diego M.	267
Dell'Anno M.	191	Diella E.	9
Dellepiane R.	227	Diex Roux G.	283
Denegri M.	164	Digregorio M.	103
D'Ercole M.	96	Dionisio F.	219
Desantis G.	157	Dionisi-Vici C.	263
Desbats M.A.	128	Ditadi A.	212
Desmond K.	151	Diverniere M.	159
Detering N.	36	Dolci S.	121
Di Bari A.	27	Domenicale C.	134
Di Berardino C.	81	Domenis R.	258
Di Bernardo D.	79	Donadon M.	53
Di Cunto F.	104	Doni D.	31
Di Donfrancesco A.	71	Donzel D.	36
Di Filippo L.	191	Dorchies Olivier M.	15
Di Girolamo D.	246	Dosi C.	9
Di Giulio S.	64	Draghici E.	159

Dufrusine B.	61
Dumitras A.G.	6

E

Elvassore N.	96
Enrica P.	85
Erica Lucia C.	244
Ericson M.	224
Erreni M.	92
Esk P.C.	175
Esposito A.	234
Esposito F.	191
Esposito M.	51
Esposito S.	219
Eszter T.	185
Eva D.O.F.	91
Ewe A.	156

F

Faà V.	201
Fabiano A.	221
Fabretti F.	64
Fabrizi A.	248
Facchinello N.	57
Failli M.	79
Falchi F.A.	32
Falcinelli E.	216
Falcone G.	26
Fallarino F.	209
Farace M.G.	98
Fattorini G.	125
Faucz F.	185
Fava L.	225; 238
Favero M.	53
Fecarotta S.	272; 276
Federica C.	91

Federti E.	215
Feltri L.	144
Fenech A.	134
Ferla R.	191
Ferlazzo G.M.	132
Ferlini A.	4; 11
Fernandez-Vizarra E.	44; 55
Ferrante L.	52
Ferrantini C.	21
Ferrari F.	20
Ferrari G.	219
Ferrari S.	228; 232
Ferrari V.	34
Ferri C.	144
Ferrini B.	117
Ferrua F.	218; 219
Ficara F.	159; 211
Fiermonte G.	40
Figiel M.	131
Filipello F.	138
Filocamo G.	253
Finazzi V.	115
Fiore E.	57
Fiore M.	160
Fiorenza M.T.	140
Fiorillo C.	11; 27
Florio F.	12
Folci A.	92
Follenzi A.	208
Forastieri C.	106
Forlino A.	153
Fornasari D.	45
Forni C.	274
Forti F.	32
Fortunato M.	276
Forzati F.	283

Fossati M.	92	Gambarotto L.	17
Fracasso C.	62	Gambetta A.M.	132
Fraldi A.	269	Gandossini S.	7
Francesca Z.	100	Garavaglia B.	281
Franchi F.	88	Garavaldi T.	84
Franchin C.	44	Garbelli A.	173
Franchini E.	127	Garbellini M.	147
Franchini M.	255	Garcia--Manteiga J.M.	26
Franck P.	91	Garcia--Piqueras J.	187
Franco Romero A.	39	Gargaro M.	209
Franco B.	52; 56; 187	Gargini M.C.	189
Francolini M.	108	Gargioli C.	2
Franke M.	185	Garibaldi N.	153
Fraviga E.	108	Gasperini S.	276
Freilinger T.	47	Gattillo S.	218
Freschi M.	123	Gavazzo Paola	47
Frisari S.	48	Gavazzo Paola	94
Frosini S.	9	Gazzerro E.	1
Frustaci A.	257	Geginat J.	227
Fuller H.	36	Gemignani F.	139
Fuoco C.	2	Genazzani A.A.	22
Fusco G.	269	Gennaccaro L.	75
<hr/>		Genovese M.	242
G		Gentile A.	98
Gabellini C.	244	Gentile D.	51
Gabriele M.	113	Gentner B.	157; 159; 218; 219; 268; 274
Gagliano O.	96	Germain P.	115
Galatolo D.	68; 128; 139	Gherardi G.	39
Galbiati M.	34	Ghezzi D.	71
Galbusera A.	95	Ghezzi S.	167
Galeone A.	196	Ghigo A.	241
Galiano L.	269	Ghirardini E.	95
Galiotta L.J.V.	242	Ghiroldi A.	136
Galimberti E.	132	Ghirotto F.	237
Galvani G.	75	Ghzaiei I.	12
Gambardella G.	255	Giaccio M.	269

Giacomello M.	71; 127
Giacomo D.A.	214
Giada M.	214
Giamundo G.	190
Giannelli Serena.....	105; 132
Giannelli Stefania.....	218; 219
Giannini Giuseppe	64
Giannini Greta Carola	83
Giannotta M.	9
Giaquinto L.	260; 279
Gibson W.	113
Giglio E.	205
Gilberti E.	117
Gilea A.I.	57
Gillingwater T.	36
Giordano A.M.S.	41
Giordano C.	87
Giorgetti S.	163; 200
Giorgi F.M.	40
Giorgia M.	227
Giorgini L.	125
Giorgio E.	171
Giovannini M.G.	117
Giuseppina G.	267
Giustetto M.	75
Gobbi M.	62
Golini E.	26
Gorgoglione D.	4
Goti A.	262
Gourdon G.	26
Gozzi A.	95
Granata V.	167
Grande V.	62
Grasso Alexia	185
Grasso Anna	62
Grasso E.	65

Gregori S.	276
Gresele P.	205; 216
Grierson A.	125
Grifagni D.	31
Grimaldi A.	247
Gritti A.	121; 123; 136
Groen E.	36
Grumati P.	14; 51
Guarino Andrea	279
Guerra M.	37
Guichard P.	238
Guida F.	60
Guidone D.	242

H

Hamel V.	238
Harding I.	72
Hentschel A.	65
Hernandez Soto R.	138
Hiroyuki N.	75
Hirsch E.	241
Hiscott J.	140
Huang Y.T.	36
Hughes J.	113

I

Iannelli F.	231
Imbrici P.	135
Indrieri A.	52; 56; 187
Inga A.	36
Innocenti N.	149
Intartaglia D.	190
Iovino L.	95
Izzo M.	26

J

Jackson A.	101
Jaspers Y.	39
Jaudon F.	60
Jofra Hernandez R.	204; 218
Jofra--Hernandez R.	273; 274

K

Kaesler F.	280
Kajaste--Rudnitski A.	41; 123
Karali M.	187
Kemp S.	39
Khastkhodaei Ardakani M.	104
Kheir E.	12
Kilstrup--Nielsen C.	74; 76
Kopecka J.	65
Krenn V.	175
Kruger M.	6
Kukavica D.	164
Kumawat A.	164
Kunderfranco P.	147

L

La Monica V.	64
La Rosa P.	140
Lacombe A.	188
Laface I.	136
Lago S.	182
Lagostena L.	160
Lai Matteo.	72
Lai Michele.	244
Lampis A.	200
Lana D.	117
Landi S.	84
Landsberger N.	108; 110

Lania A.	185
Lanzuolo C.	20
Laporte M.	238
Lasorsa F.M.	40
Latella M.C.	248
Laterza C.	96
Laura D.R.	248
Laura F.	91
Lauria A.	208
Lauria F.	36
Lavatelli F.	200
Lavigna G.	62
Lazarevic D.	26
Leeb M.	132
Lembo G.	20
Lennon--Dumenil A.	230
Lentini G.	164
Leone D.	7; 9
Leone R.	83
Levi S.	142
Lezzi A.	167
Liaci C.	99
Liantonio A.	135
Libergoli M.	12
Licitra R.	68; 135; 139
Lidonnici M.R.	219
Liu D.	110
Liuzzi G.	48
Llado M.	191
Lo Riso P.	113
Lobasso S.	256
Lodato S.	147
Lodi T.	57
Lodovichi C.	84
Loffreda A.	241
Loi M.	75

Lombardo A.	70; 133; 208; 265	Manni G.	209
Lonati C.	147	Manuel M.	91
Longaretti L.	203	Manzoni M.	21
Lopa S.	268	Mapelli A.	41
Lopez Tobon A.	113	Marafelli I.	127
Lora C.	74; 76	Maragliano L.	88
Lorenzati M.	104	Marando V.A.	171
Lucchetti J.	62	Marano V.	280
Lucidi B.	118	Marazziti D.	249
Lugato P.	193	Marchese L.	200
Lukacs G.	241	Marchese M.	68; 135; 139
Luoni M.	101; 103; 105; 132	Marchioretto M.	36
Lupo M.	191; 194	Marenco C.	175
<hr/>			
M			
Maftai E.S.	48	Maresca A.	87
Maghin E.	2	Marigo V.	189
Maglione V.	131; 132	Marika A.	84
Magnifico M.C.	40	Marinelli E.	231
Magrassi R.	197	Marini A.	37
Magri F.	4; 9	Marini G.	248
Mainardi M.	81	Marktelt S.	219
Maioli S.	227	Marongiu M.F.	201
Maj D.	244	Marracino F.	131
Malerba G.	118	Marrocco E.	191; 194
Malinverni S.	200	Martelli F.	26
Mallamaci A.	48	Martello A.	177
Malpeli G.	118	Martello G.	96; 132
Mammano F.	249	Martin I.	268
Mancheno--Ferris A.	231	Martinelli D.	263
Manchinu M.F.	201	Martini D.	103
Mancino M.	273	Martino S.	123
Mandillo S.	26	Marzi C.	72
Manfredi A.	191; 247	Marzullo M.	29
Mangione Palma Patrizia	200	Mascalchi M.	72
Mangione Patrizia	163	Masone A.	62
		Massa F.	56; 127
		Massaro F.	52

XXI CONVENTION SCIENTIFICA 13-15 MARZO 2023

Massenzio F.	40	Merlo G.	99
Masson R.	7; 11	Mero S.	68; 128; 135; 139
Matassini C.	262	Mesa Nunez C.	204
Materozzi M.	154	Messina S.	4; 7; 11
Mathur V.	12	Metti S.	17
Mattarei A.	53; 124	Mezzasoma A.M.	216
Mattè A.	215	Michetti C.	88
Matteoli M.	138	Midena F.	232
Matti V.	231	Migliara A.	70
Mattivi A.	225; 238	Migliorati D.	238
Mattoscio D.	215	Mignogna L.	62
Mauri P.	200	Milan E.	154
Maurizi A.	151; 156	Milani G.	164
Mazza T.	173	Milani M.	221
Mazzanti A.	164	Mimmi M.C.	163; 200
Mazzaro N.	194	Missero C.	246
Mazzola M.	162	Misurale F.	47
Mazzoleni S.	80	Molinari M.	56
Mazzotta C.	171; 173	Molineris I.	208
Medici G.	75	Monaco A.	269
Medina D.L.	271; 277	Monaco M.	271
Melotti P.	241	Mongini T.	4
Melzi V.	147	Montagni E.	177
Mencarelli G.	209	Montani C.	95
Mendonca A.P.	188	Monti B.	40
Menè P.	151	Monti I.	218
Meneghini V.	136	Montini E.	157; 218; 219
Mercaldo V.	98	Monzani E.	134
Mercolini L.	40	Moons S.J.	131
Mercuri Eugenio	7; 9; 27; 37	Morari M.	134
Mercuri Eugenio Maria	4	Moregola A.	261
Mercurio S.	175	Morena F.	123; 136
Merelli I.	41; 70; 157; 159; 218; 221; 232	Morengi E.	167
Mergiotti M.	241	Moresco R.M.	117
Merla G.	281	Moretti Matrta	64
Merlin S.	208	Moretti Matteo	268

Moretto E.....	93
Mori F.....	117
Morini R.....	138
Morleo M.....	285
Moro E.....	132
Moroni A.....	83
Moroni I.....	4; 27
Morrone A.....	262; 274
Mortarini G.....	171
Mortellaro A.....	204
Mosca R.....	103
Mottolese N.....	75
Murabito A.....	241
Murgia A.....	96
Muro A.F.....	258
Musante I.....	49; 60
Mutarelli M.....	285
Muzzi L.....	60

N

Nacht M.....	224
Naef V.....	68; 128; 139
Naldini L.....	219; 228; 232
Naldini M.....	157; 159
Napolitano G.....	234
Nardi G.....	84; 135; 139
Nardin C.....	249
Nardini I.....	117
Natalello A.....	200
Negri C.....	265
Negri M.L.....	182
Negueruela S.....	187
Nencini S.....	85
Neuhauss S.....	139
Newman O.....	151
Nicole D.....	91

Nicolis Di Robilant V.....	64
Nicolis S.K.....	175
Nigro V.....	191; 281; 285
Nizzardo M.....	147
Nizzari M.....	197
Nocerino P.....	200
Nogara L.....	6
Norata G.D.....	261
Norata R.....	273
Novelli V.....	21
Nusco E.....	191; 224

O

Occhetta P.....	162
Ogi A.....	68; 135
Oleari R.....	170
Olgasi C.....	208
Oliviero S.....	208
Omrani M.....	219
Ongaro A.....	124
Onore M.E.....	285
Oppezzo A.....	231
Orefice M.....	179
Ori M.....	170; 179
Orsi A.....	173
Orsini T.....	249
Orsolini S.....	72
Ostuni R.....	207; 218
Ottaviano E.....	78
Ottoboni L.....	147
Ottonelli I.....	189

P

Pacini G.....	218
Pacini L.....	98
Padmanaban A.....	191

XXI CONVENTION SCIENTIFICA 13-15 MARZO 2023

Padula A.....	224	Patrizii P.....	151; 156
Pagani I.....	167	Paulikova K.....	127
Paganin M.....	36	Paulis M.....	228
Paganoni A.J.J.....	170	Pavarino G.....	36
Pagliarani S.....	147	Pavesi G.....	32; 175
Pagliarini V.....	37	Pavone F.S.....	177
Paiardini A.....	248	Peano C.....	162
Pais G.....	219	Pedemonte M.....	9
Palermo C.....	9	Pedemonte N.....	198; 241
Palermo E.....	140	Pedini G.....	98
Palladino E.....	153	Pedrotti G.....	118
Pallavicini G.....	104	Pegoraro E.....	4; 7; 11; 17; 281
Palmeira L.....	185	Pelassa S.....	253
Palmieri L.....	40	Peluso G.....	191
Panariello F.....	247	Pendin D.....	33; 124
Pane M.....	9; 11	Penna S.....	159; 268
Panicucci C.....	1	Pennuto M.....	34
Paola B.....	91	Pepe G.....	131; 132
Paoli A.....	274	Pera M.C.....	37
Paolo R.....	214	Peres C.....	249
Papa F.T.....	12	Perfetti A.....	26
Papaleo F.....	90	Perna C.....	224
Paplekaj A.....	106	Perotti I.....	244
Parenti G.....	272; 276	Perseu L.....	201
Pareyson D.....	144	Peruzzi G.....	64
Parini R.....	274	Peruzzo R.....	53
Parlato R.....	131	Pessolano E.....	22
Parolisi R.....	104	Petretto A.....	198
Pasini C.....	62	Petrogiannakis G.....	187
Pasquini G.....	84	Petroni M.....	64
Passafaro M.....	93	Petrosino S.....	51
Passamano L.....	7; 9; 11	Petrossians P.....	185
Passerini L.....	276	Petruzzelli R.....	222
Pastore P.....	44	Pettinato E.....	204
Patanella L.....	235	Pezzali M.....	113; 115
Patrizia D.....	100	Pezzella N.....	52

XXI CONVENTION SCIENTIFICA 13-15 MARZO 2023

Pezzini S.	108	Poletti A.	34
Pflug F.	132	Poli G.	167
Piano I.	189	Polishchuk E.	222; 235; 279
Piazza R.G.	80	Polishchuk R.	222; 279
Picciotti I.	123	Polito A.	180
Picco C.	94; 197	Pollara L.	171
Piccolella M.	34	Polli R.	96
Piccoli Giorgia	6	Polonara F.	64
Piccoli Giovanni	134	Pompilio G.	21
Piccoli Marco	136	Porcelli V.	40
Piccoli Martina	2	Porcellini S.	228
Piccolo P.	224	Porcu S.	201
Piccolo A.	160	Porro A.	83
Pieroni B.	209	Potenza F.	61
Pifferi M.	244	Pozzi D.	108
Pignataro A.	40	Pozzolini G.	175
Pinelli M.	285	Pozzu D.	113
Pini A.	4; 7; 11; 27	Pracucci E.	84
Pinotti M.	110	Pramaggiore P.	34
Pinton P.	65	Prandi L.	99
Pintus S.	1	Previtali Stefano	4; 11
Pioner J.M.	21	Previtali Stefano Carlo	7
Piperno G.M.	230	Principi E.	1
Pisano A.	87	Priori S.G.	164
Pisano I.	40	Protasi F.	24
Pischedda F.	134	Protti M.	40
Pisciotta C.	144	Provenzano C.	26
Pistello M.	244	Pucci E.	151
Pitolli C.	37	Puccio S.	162
Pizzati L.	131	Pugni E.	194
Pizzo M.	187; 272	Pusch M.	47; 94
Pizzoccheri R.	32	Putignano E.	78
Pizzorusso T.	75; 78	Putti S.	249
Plati T.	228		
Poddie D.	201		
Poeta E.	40		
		Q	
		Quaranta P.	204; 218; 273; 274

Quattrone A. 36

R

Rabino M. 21

Radrizzani M. 228

Raffaghello L. 1

Raggi F. 253

Raimondi A. 241

Raimondi S. 200

Rainone P. 117

Rampado R. 188

Rampoldi L. 237

Randi S. 76

Rando S. 99

Rapposelli S. 139

Raspa M. 26; 249

Ratto G.M. 84; 135; 139

Ravarotto S. 57

Ravasenga T. 88

Razzano F. 194

Rebuffini P. 145

Recchiuti A. 215

Reggio A. 14

Regoni M. 134

Rembaum P. 71

Renda M. 242

Renieri A. 281

Resnati M. 154

Restelli E. 62

Ricca A. 121; 123

Ricci F. 7; 9; 11; 27

Ricciardi S. 279

Ricciuti D. 209

Rigamonti C. 204

Rigamonti M. 249

Riganti C. 65

Rigoldi L. 48

Rilievo Angela. 274

Rilievo Angela Antonia 218

Riminucci M. 268

Rinaldi M. 262

Rinaldo C. 125

Rinaldo S. 152

Ripamonti M. 142

Risato G. 57

Ristaldi M.S. 201

Ritelli M. 250

Riva E. 154; 211

Riva M. 121

Rizzo F. 147

Rocchi M. 273

Romanello V. 39

Romani M. 173

Romani P. 132

Romano A. 204

Romano E. 203

Romei A. 88

Romito E. 106

Roos A. 65

Rosina E. 98

Rossa A. 53

Rossi B. 277

Rossi C. 253

Rossi E. 118

Rossi M. 105

Rossiello F. 231

Rosso I. 231

Rossomanno I. 136

Rotoli V. 283

Rovelli E. 228

Roverso M. 44

Rovina D. 21

Ruatti C.	36	Salviati L.	39; 55; 128
Rubino R.	269	Sambri I.	127
Rubio A.	142	Sanchez--Duffhues G.	152
Ruepp M.D.	147	Sandakly J.	108
Ruggeri R.	60	Sandonà D.	2; 120
Ruggieri A.G.	61	Sandro M.	267
Ruiz--Ceja K.A.	187	Sanges D.	283
Rusconi F.	106	Sangiorgi L.	281
Rusmini P.	34	Sansone V.	4; 7; 27
Russo F.	221	Santalla M.	33; 124
Russo Massimo 9		Santamaria G.	198
Russo Matteo Antonio 257		Santambrogio P.	142
Russo S.	256	Santanatoglia C.	118
<hr/>			
S			
Saba E.	211	Santarelli P.	20
Sabata M.	136	Santi L.	268; 273; 274
Sabatelli P.	17	Santorelli Filippo 71	
Sabbatini D.	4	Santorelli Filippo M.	128
Sabbioneda S.	173	Santorelli Filippo Maria 68; 135	
Sacchetti G.	87	Santoro Massimo 193	
Sacconi L.	21	Santoro Michele 260; 279	
Sachetto R.	2	Sanvito F.	265; 273
Sagona G.	95	Saponaro A.	16; 83
Sala A.	153	Sara R.	214
Sala C.	112	Sardina F.	125
Sala M.	106	Sarnari F.	209
Salamone A.	81	Sarnicola M.L.	227
Salamone G.	179	Sassone J.	134
Salani S.	147	Saurino R.	56
Salena M.T.	198	Saveri P.	144
Salierno F.	190	Savoli S.	179
Sallese M.	61	Saxena H.	258
Salmaso S.	188	Sbrana F.	94
Salmin F.	27	Scala S.	204; 218; 219; 273; 274
Salvarani N.	162	Scalabrin M.	39
		Scali C.	117
		Scalisi G.	209

XXI CONVENTION SCIENTIFICA 13-15 MARZO 2023

Scandella L.	108	Signoria I.	36
Scano M.	2; 120	Signorile A.	256
Scanziani E.	159	Simbula M.	201
Scaramuzza S.	219	Simonato M.	124; 193
Scarfò R.	212	Simoni C.	221; 265
Scarselli P.	131	Smal N.	173
Scavizzi F.	26; 249	Sobacchi C.	159; 167
Schaeffer C.	237	Sofia M.	277
Scheda R.	72	Somma C.	271
Schiavone M.L.	167	Sonda S.	33; 124
Schweizer U.	120	Sondo E.	198; 241
Sciacco M.	281	Sönmez A.	131
Scialla R.	257	Sonntag S.	153
Scolz A.	129	Sorio C.	241
Scorrano L.	188	Sorrentino G.	225
Scudieri P.	1; 49; 60	Sorrentino N.C.	277
Sebastiani S.	113	Sorrentino V.	24
Seffin L.	218	Sottile V.	171
Segel R.	71	Spampanato C.	285
Sellitto C.	249	Specchio N.	176
Selvestrel D.	225	Spinelli A.	273
Sepe S.	231	Spinelli M.	224
Serani A.	180	Spinozzi G.	219
Sergio M.C.	279	Stagni V.	152
Serpieri V.	171; 173	Staiano L.	235
Servidei S.	4	Starinieri F.	221; 265
Sessa A.	101	Stefania G.	85
Sessa R.L.	152	Stefania O.	214
Sette C.	37	Stefano B.	214
Sevegnani M.	134	Stelitano D.	280
Sgromo C.	208	Stellato T.	171
Shackleford G.	144	Sterlini B.	88
Sharifzadeh A.S.	83	Stoppacciaro A.	151
Sharma G.	36	Stratakis C.	185
Shyti R.	115	Strimpakos G.	26
Siciliano G.	9	Strollo S.	277

Stuart H.....	96
Summaria B.	283
Surace E.M.....	56; 191
Sureda Horrach P.	191
Switonska--Kurkowska K.	131
Szabo I.	53

T

Taccagni C.M.....	171
Tacchetti C.	241
Tagliatti E.	138
Tahraoui--Bories J.	41
Taiana M.	147
Tammaro R.....	52; 56
Tanini D.	262
Tartaglia M.....	176
Tassinari M.....	75
Tavazzani E.....	164
Tavella S.	231
Tavella T.	232
Taverna D.	253
Tebaldi T.....	36
Tedesco B.	34
Telethon Undiagnosed Disease Program S.G.	285
Tenderini E.	194
Tesoriero C.....	237
Tessa A.	128
Testa G.	113; 115; 175
Testa M.	235
Teti Anna.....	151
Teti Anna Maria	156
Tiano S.M.L.	280
Tiberi J.	140
Tiranti V.....	142
Tirosh A.....	185
Tirozzi A.	285

Tiso N.	57
Tiziano F.D.	37
Toffolo E.	106
Tognini P.	78
Tognozzi A.	78
Tolosano E.	65
Tomasoni D.....	276
Tomasoni S.	203
Tondi F.	205; 216
Tondinelli S.	171
Tonduti D.....	120
Tonetti M.....	168
Tonetto E.	110
Torella A.	191; 285
Tornabene P.....	191
Torrente Y.	12; 16
Tosi G.....	189; 193
Trancuccio A.	164
Trani G.	39
Trapani I.	191; 194
Trattaro S.....	113; 115
Trazzi S.....	75
Trionfini P.	203
Tripodo C.....	231
Trisciuglio D.....	152
Trivellin G.	185
Trivisano M.....	176
Tropeano C.V.	87
Trucco F.	27
Tsushima H.....	180
Tucci F.....	219; 268; 274
Tucci V.	180

U

Unali G.	123
Urciuoli G.	246

V

Vaccargiu S.	201
Vaccari T.	196
Vaccaro L.	247
Valassina N.	81
Valastro S.	74; 76
Valente E.M.	171; 173
Valente P.	88
Valenzano S.	144
Valeri E.	41; 123
Valetti G.	74
Valsoni S.	70
Valtorta F.	134
Valtorta S.	117
Van Der Hoorn D.	36
Vannini E.	104
Varavallo A.	285
Varinelli M.	203
Vasco C.	227
Vavassori V.	228
Vencato S.	12
Venditti R.	279
Venturini A.	242
Venturini M.	250
Verardo M.	257
Verardo R.	257
Vercelli A.	34
Verona G.	163; 200
Verpelli C.	112
Vetralla M.	33
Vettori A.	237
Vicenzi E.	167
Viero G.	36
Viggiano L.	40
Vignoli A.	78

Villa A.	159; 228; 268
Villa C.	16
Vincenzo Nigro V.	4
Vinci E.	112
Viscomi C.	42; 44; 53; 55; 71
Visigalli I.	273; 274
Viti F.	196; 197; 198
Vitiello A.	249
Vitobello A.	179
Vitriolo A.	113; 115
Vlachová Š.	280
Voellenkle C.	26
Volpe E.	152
Volpe G.	40
Volpe M.	56
Volpin M.	157
Volta S.	55

W

Walker G.	208
Wang C.	224
Weckhuysen S.	173
Weksberg R.	113
White T.	249
Wilson C.	279
Wits M.	152
Wrabetz L.	144

X

Xynomilakis O.	78
---------------------	----

Y

Yang G.	249
Yednock T.	12

Z

Zambimini G.	273	Zeuli R.	285
Zambon A.	11	Zeviani M.	42; 44; 53; 55; 71
Zamfir R.G.	118	Zhang S.	224
Zampieri S.	128	Zimbardi B.	283
Zampini M.	211	Zippo Alessio	182; 183
Zanardi A.	117	Zippo Antonio	112
Zanardi I.	94	Zischka H.	222
Zanetti L.	134	Zonari E.	157; 159
Zang J.	139	Zonta F.	249
Zanobio M.	285	Zoppi N.	250
Zanolini A.	9	Zoratti M.	53
Zara F.	49; 60	Zorzan I.	96
Zecchilo A.	159	Zuccato C.	129
Zecchinelli A.	281	Zuccoloni P.	94
Zentilin L.	258	Zulkifal M.	121
		Zurlo G.	117